

Über die glatte Muskulatur erregende
Substanzen aus Milch

von

LOTHAR HENSELMANN

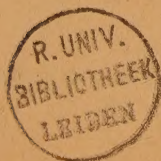
Aus der Chirurgischen Klinik der Universität München
ehem. Direktor: Prof. Dr. E. K. Frey

Über die glatte Muskulatur erregende Substanzen
aus Milch.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Lothar Henselmann
aus Leiz b. Sigmaringen

1959



Referent: Prof. Dr. Dr. E. Werle

Coreferent: Prof. Dr. R. Zenker

Dekan: Dr. H. Schwiegk

Teg der mündlichen Prüfung: 10. 9. 1959

Inhaltsübersicht

	Seite
Teil I.	
Laktokinin, eine darm-und uterusaktive Substanz	
aus Milch bzw. Molke.....	1
Anreicherung von Laktokinin.....	2
Reinigung von Laktokinin durch Säulenchromatographie.....	3
Abgrenzung von Laktokinin gegen Histamin.....	7
Löslichkeit von Laktokinin in Äther, Aceton, Äthyl- alkohol, Metanol und Butanol.....	11
Pharmakologische und chemische Eigenschaften von Laktokinin.....	12
Zusammenfassung der Versuchsergebnisse von Teil I.....	13
Teil II.	
Über die Entstehung einer uterusaktiven Substanz bei Inkubation von Blutserum mit Colostrum.....	16
Abgrenzung von Colostrokinin gegen die Substanz "Serum + Wasser".....	22
Kann Colostrokinin einen trächtigen Uterus zur Kontraktion bringen?.....	23
Colostrokininogenase- und Colostrokininasekonzentration im Schwangerenserum.....	24
Hemmung der Colostrokininase durch Parachlormercuri- benzoesäure.....	32
Colostrokininase in der Placenta.....	34
Charakterisierung der Colostrokininogenase.....	35
Colostrokininbildung bei verschiedenen p_H -Werten.....	37
Anreicherung des Colostrokininogens.....	39
Charakterisierung von Colostrokinin.....	43
Zur Abgrenzung der Colostrokininase von Oxytocinase.....	46
Die Colostrokininogen-Konzentration an verschiedenen Tagen zu Beginn der Laktationsperiode.....	48
Umwandlung von Colostrum in normale Milch.....	50
Zusammenfassung der Versuchsergebnisse von Teil II.....	54

E I N L E I T U N G

Blutplasma enthält in der α_2 -Globulinfraktion ein Eiweiß, das durch verschiedene Fermente, z. B. durch Trypsin, so zerlegt werden kann, daß eine blutdrucksenkende, uterus- und darmerregende Substanz entsteht, die als Kallidin^{1,7}, Bradykinin⁶, oder kurz als Kinin^{2,3,4} bezeichnet wird.

Es erhob sich die Frage, ob die Vorstufe des Kinins, das sog. Kininogen, auch in der Milch sich findet. Dabei ergaben sich die im folgenden geschilderten Beobachtungen.

Über die glatte Muskulatur erregende Substanzen

aus Milch.

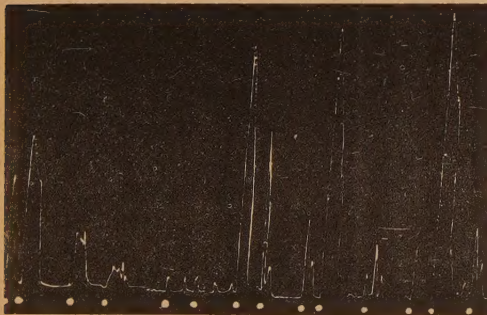
I. Laktokinin, eine darm- und uterusaktive Substanz aus Milch bezw. Molke.

Handelsübliche Frischmilch enthält in geringer Menge eine darm- und uterusaktive Substanz (vgl. hierzu die Originalmitteilung E. Werle und F. Freisser Naturwissenschaften 1956, S. 375).

Wird aber sofort nach dem Melken der Milch Penicillin zugesetzt, so ist keine Aktivität der Milch am Darm oder Uterus festzustellen.

Es ist also wahrscheinlich das Auftreten dieser Substanz auf den Stoffwechsel der in der Milch wachsenden Bakterien zurückzuführen.

Am isolierten Meerschweinchendarm oder Uterus entspricht die Aktivität von 1 ml frischer pasteurisierter Vollmilch etwa der von 0,01 Gamma Histamin; (vgl. Abb. 1.)



- 1= 0,1 Gamma Histamin
- 2= 0,2 " "
- 3= 0,5 ml Frischmilch
- 4, 5, 6= je 1 ml "
- 7= 0,1 Gamma Histamin
- 8= 0,05 " "
- 9= 1 ml Frischmilch
- 10= 0,05 Gamma Histamin
- 11= 1 ml Frischmilch
- 12= 0,5 ml "
- 13= 0,05 Gamma Histamin
- 14= 0,01 " "

Abb. 1: Isolierter Meerschweinchen-Dickdarm (3 cm lang, in 9 ml Thyrodelösung suspendiert).

Läßt man die Milch einige Tage bei Zimmertemperatur stehen, sodaß sie gerinnt, so nimmt ihre Darmaktivität bis aufs 10- fache zu. Die Milch bewirkt am isolierten Meerschweinchendarm eine umso stärkere Kontraktion, je länger sie aufbewahrt wird, d. h. je länger die Bakterien in ihr wirken. So nimmt bei monatelangem Stehenlassen die Aktivität der Molke bis aufs 50000- fache zu

Abb. 2: Kontraktionen des isolierten Meerschweinchendarms; die Molke konnte nur in verdünnter Form gespritzt werden, da schon die Wirkung von 0,002 ml der von 0,3 Gamma Histamin entsprach.



- 1= 0,3 Gamma Histamin
- 2= 0,3 " "
- 3= 0,002 ml Laktokinin
- 4= 0,002 ml " "

Anreicherung und Isolierung von Laktokinin.

Wird geronnene Milch in Celophanbeuteln gegen das doppelte Volumen dest. Wasser dialysiert, so findet sich nach 10 Stunden etwa die Hälfte der aktiven Substanz im Außendialysat. Bei mehrmaligem Wechsel des Außendialysates kann man nahezu alles in der Molke vorhandene Laktokinin gewinnen. Beim Einengen des Außendialysates in Luftatmosphäre geht ein Teil unserer Substanz verloren; wir vermuteten, daß Laktokinin gegen Sauerstoff empfindlich ist. Ebenso wie durch Sauerstoff wird die Substanz auch durch Wasserstoffsuperoxyd angegriffen. Es ist also zweckmäßig, Laktokinin möglichst wenig mit Sauerstoff in Berührung zu bringen; wir engen es daher im Stickstoffvakuum ein.

Abb. 3: Testobjekt: Meerschweinchendarm. Leitet man durch eine Laktokininlösung 30 Min. lang einen Sauerstoffstrom, so verschwindet die Aktivität vollkommen (s. "3"). Die unter "2" zu erkennende Aktivität ist z. T. auf die Wirkung des Wasserstoffsuperoxyds (= "5") zurückzuführen.



- 1= 2,0 ml Laktokinin
- 2= 2,0 " " + Wasserstoff-superoxyd
- 3= 2,0 ml " + Sauerstoff
- 4= 1 Gamma Histamin
- 5= 2,0 ml Wasser + Wasserstoff-superoxyd.

Reinigung von Laktokinin durch Säulenchromatographie.

1. Wird Laktokinin an Aluminiumhydroxyd adsorbiert?

Das eingeengte Außendialysat von Molke wurde durch eine Aluminiumhydroxyd-Säule geleitet und fraktioniert aufgefangen. Die Darmaktivität blieb erhalten; Laktokinin wird also nicht an Aluminiumhydroxyd adsorbiert. Im aufsteigenden Papierchromatogramm konnte festgestellt werden, daß auch die übrigen Stoffe, die in unserem Ausgangsmaterial enthalten sind, in der Aluminiumhydroxyd-Säule nicht zurückgehalten werden, sodaß also auf diesem Wege keine Reinigung unserer Substanz erreicht werden kann.

Dasselbe negative Ergebnis erhielten wir beim Versuch, Laktokinin an den Anionenaustauscher Amberlite IR-4B zu adsorbieren, wobei die Molke aus der IR-4B -Säule in 11 Fraktionen aufgefangen wurde und die aktive Substanz ab Fraktion 3 vorlag (Abb.4).

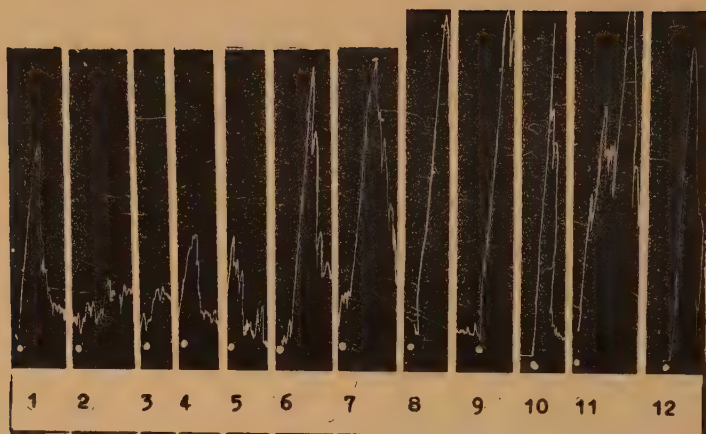


Abb. 4: 1= 0,1 ml Molke
 2= 0,5 ml der Fraktion 1 aus Amberlite IR-4B
 3= 0,5 ml " " 2 " " "
 4= 0,5 ml " " 3 " " "
 5= 0,5 ml " " 4 " " "
 6= 0,5 ml " " 5 " " "
 7= 0,5 ml " " 6 " " "
 8= 0,5 ml " " 7 " " "
 9= 0,5 ml " " 8 " " "
 10= 0,5 ml " " 9 " " "
 11= 0,5 ml " " 10 " " "
 12= 0,5 ml " " 11 " " "

Der Kationenaustauscher Amberlite IRC-50 adsorbiert Laktokinin aus saurer Lösung. Die nach dem Durchleiten des Lk.-Rohpräparates aus der Säule erhaltenen Fraktionen waren inaktiv (vgl. Abb. 5). Bei neutraler oder alkalischer Reaktion wird die Substanz nicht zurückgehalten.

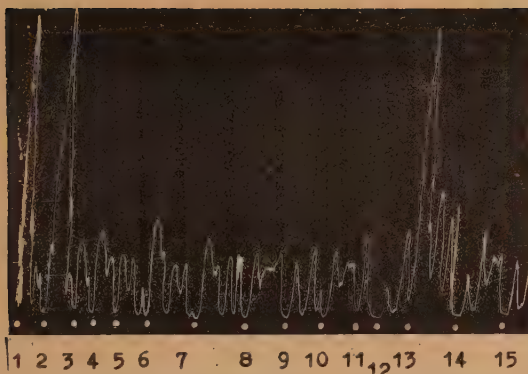


Abb. 5:

- 1= 0,2 ml Lk-Rohpräparat
- 2= 0,2 ml Lk- "
- 3-12 = Fraktionen 1-9
aus Amberlite IRC-50-Säule
- 13= 0,2 ml Lk-Rohpräparat.
- 14 u. 15 = Fraktionen 10
u. 11 aus Amb. IRC-50.

Wir versuchten nun, Lk. mit 0,1 n HCl zu eluieren. Wie Abb. 6 zeigt erschien dabei die aktive Substanz nicht. Der Durchbruch von Lk. erfolgte nach Eluation mit 0,1 n NaOH in einem scharfen Aktivitätsgipfel.



Abb. 6:

- 1= 1 Gamma Histamin
- 2-6 = Fraktionen 1-5 des
0,1 n HCl - Eluates
je 0,5 ml
- 7= 0,2 ml der Fraktion 1
- NaOH- Eluat
- 8= 0,1 ml Fr. 2
- 9= 0,05 ml Fr. 3
- 10= 1 Gamma Histamin
- 11= 0,05 ml Fr. 4
- 12= 0,1 Fr. 5
- 13= 0,1 Fr. 6
- 14= 0,2 ml Fr. 7

Das stark darmaktive NaOH - Eluat wurde angesäuert und nochmals durch die Amberlite-IRC-50-Säule geschickt. Die aktive Substanz wurde wieder vollständig absorbiert. Dann wurde mit dest. Wasser, 0,1 n HCl und schließlich mit 0,1 n NaOH nachgewaschen. Jetzt erschien Lk schon im HCl - Eluat, während das NaOH - Eluat nicht mehr darmaktiv war.

Im aufsteigenden Papierchromatogramm (Schleicher Schüll Papier No 2043 b, Butanol - Eisessig - Wasser 80:20:20 als Lösungsmittel) ergab das Lk-Rohpräparat 10-15 Ninhydrin positive Zonen, während bei dem Austauschvorgang an Amberlite IRC-50 in der Hauptsache Substanzen mit niedrigem Rf-Wert zurückgehalten und damit aus der Lösung entfernt werden.

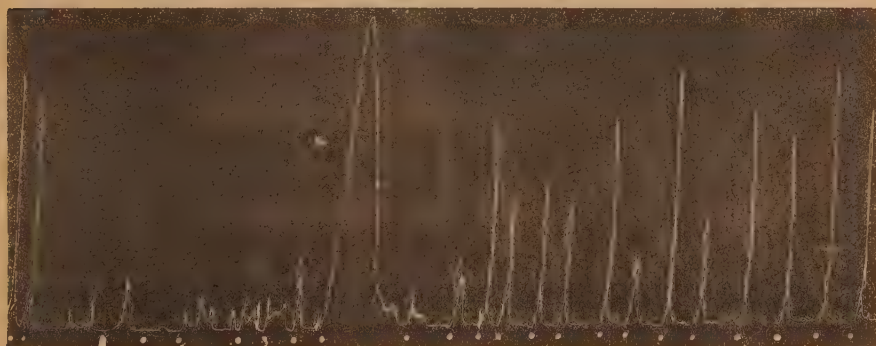
Die aktiven Eluate aus der Amberlite IRC-50-Säule wurden vereinigt und an einer Amberlite IR-4B-Cl Säule weiter entwickelt. Es kam dadurch zur weitgehenden Abtrennung der restlichen Begleitsubstanzen, so daß im Durchlauf eine Laktokininlösung resultierte, die nach Papierchromatographie mit Butanol-Eisessig-Wasser und Ninhydrinfärbung sich nahezu als einheitlich erwies.

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei dieser papierchromatographisch nachgewiesenen Substanz tatsächlich um Laktokinin handelt, wurde ein Streifenchromatogramm angefertigt. Ein Lk-Rohpräparat wurde in Streifen von 7 cm Länge auf Schleicher Schüll Papier aufgetragen und nur die beiden seitlichen Enden der Streifen mit Ninhydrin gefärbt. Die den 8 ninhydrinpositiven Flecken entsprechenden Streifenstücke wurden ausgeschnitten, zerkleinert und mit je 5 ml aqua dest. eluiert. Von den 8 Eluaten war das 1. und 8. darmaktiv. Der 1. Streifen, in welchem sich die Hauptaktivität befand, entsprach mit einem Rf-Wert von 0,12 (aufsteigendes Chromatogramm, Laufzeit 24 Stunden, Schleicher Schüll Papier No 2043 b,

Lösungsmittel Butanol-Eisessig-Wasser 80:20:20) dem Rf-Wert des Fleckes, den die gereinigte Laktokinin-Lösung im gleichartig durchgeführten Papierchromatogramm ergab.

Abgrenzung von Laktokinin gegen Histamin.

1. Fragestellung: Wird Laktokinin durch Antihistaminika beeinflusst?
200 Gamma Antistin wurden direkt ins Darmbad gespritzt. Ohne das Bad zu spülen, wurden dann gleich aktive Mengen von Histamin und Laktokinin gespritzt. Beide Stoffe waren danach inaktiv. Dagegen war Kallidin noch unverändert wirksam. Nach öfterem Spülen und nach etwa einer halben Stunde wirkten Lk. und Histamin wie vor der Antistingabe;



1-2 Antistin 200 G. 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22

Abb. 8: 1=0,25 Gamma Histamin
2=0,2 ml Laktokinin
3=0,25 Gamma Histamin
4=0,2 ml Laktokinin
5 u. 6= 0,2 ml "
7=0,25 Gamma Histamin
8= 0,2 DK
9=0,2 ml Laktokinin
10u.11= 0,25 Gamma Histamin
12u.13=0,2 ml Laktokinin
14u.15=0,25 Gamma Histamin
16=0,2 ml Lk.
17=0,25 Gamma Histamin
18=0,2 ml Lk.
19=0,15 Gamma Histamin
20=0,2 ml Lk.
21=0,25 Gamma Histamin
22=0,2 ml Lk.

2. Fragestellung: Wird Laktokinin durch Schwangerenserum, das eine stark wirksame Histaminase⁴ enthält, abgebaut?

Am isolierten Meerschweinchendarm gleich stark wirksame Mengen von Histamin und Laktokinin wurden mit Schwangerenserum inkubiert (5 Gamma Histamin bzw. entsprechende Menge Lk. zu 1 ml Schwangerenserum mens 10). Histamin wurde durch die Histaminase des Schwangerenserums weitgehend abgebaut, während die Darmaktivität von Laktokinin zwar auch etwas kleiner wurde, jedoch im Vergleich mit Histamin deutlich von diesem unterschieden werden kann.

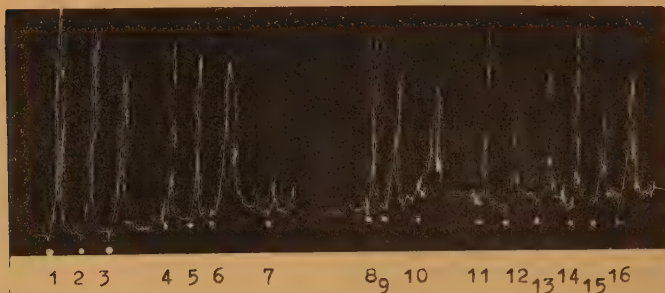


Abb. 9 zeigt die Wirkung von Schwangerenserum auf Histamin und Lk.

- 1= 0,5 Gamma Histamin
- 2= 0,5 " " + Schwangerenserum
- 3= 0,5 ml Laktokinin + "
- 4= 1; 5= 2; 6=3; je nach 10 Min.
- 7= 0,1 Gamma Histamin
- 8=1; 9= 2; 10= 3; je nach 30 Min.
- 11= 1; 12= 2; 13= 3; je nach 50 Min.
- 14= 1; 15= 2; 16= 3; je nach 70 Min.

Die Tatsache, daß Laktokinin beim Kochen nicht vollständig zerstört wird und daß es nach Inkubation mit Schwangerenserum zu einem kleinen Teil abgebaut wird, ließ vermuten, daß in unserer

Laktokininlösung noch Histamin, dessen Entstehung in Milch durchaus denkbar wäre, vorhanden ist.

Zur Abtrennung des Histamins wurden 200 ml Lk-Lösung mit dem gleichen Volumen n-Amylalkohol bei p_H 10 kräftig ausgeschüttelt. Die untere, wässrige Phase, in der Laktokinin verbleibt, wurde von der oberen Phase (Amylalkohol und Histamin) im Scheidetrichter getrennt. Das Ausschütteln wurde viermal wiederholt. Da der Siedepunkt von Amylalkohol höher liegt als der von Wasser, konnte der Alkohol durch einfache Destillation nicht aus der Lösung entfernt werden. Er wurde daher mit Äther aus der unteren, wässrigen Phase extrahiert und dieser im Vakuum abdestilliert. Die Wirkung der von Histamin befreiten Lösung wurde nun mit der Wirkung der Ausgangssubstanz am Darm verglichen.



1 2 3 4 5 6 7 8

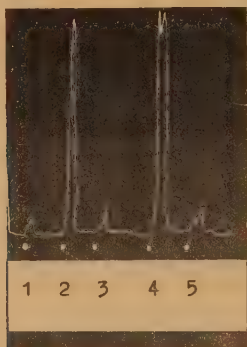
Abb. 10: Isolierter Meerschweinchen-darm.

- 1= 0,02 ml Laktokinin
- 2= 0,03 ml "
- 3= 0,04 ml "
- 4= 0,04 ml " nach Behandlung
mit Amylalkohol
- 5= 0,03 wie "4"
- 6= 0,03 ml wie "4"
- 7= 0,02 ml Laktokinin
- 8= 0,02 ml "

Die Darmaktivität des enthistaminisierten Lk war etwa um ein Drittel schwächer als die der Ausgangssubstanz.

Das gereinigte Lk wurde nun auf seine Kochbeständigkeit geprüft. Nach einstündigem Kochen war am isolierten Meerschweinchendarm keine Aktivität mehr festzustellen; unsere Substanz kann also nicht mit Histamin identisch sein, da Histamin durch Kochen nicht zerstört wird.

Abb. 11: 1= 0,05 ml Lk (enthistamin.), 1 Std. gekocht.
2= 0,05 ml " " "
3= 0,05 ml " " " 1 Std. "
4= 0,04 ml " " " "
5= 0,04 ml " " " 1 Std. "



Für die Verschiedenheit von Histamin und Laktokinin spricht auch folgender Versuch: Am Darm gleich stark wirksame Mengen von Histamin und Lk wurden am narkotisierten Hund gespritzt; dabei bewirkte Lk eine stärkere Blutdrucksenkung als Histamin.

Löslichkeit von Laktokinin in Äther, Aceton, Äthylalkohol,
Methanol und Butanol..

20 ml einer wässrigen Laktokininlösung wurden mit je 80 ml Lösungsmittel gemischt; der Niederschlag wurde abzentrifugiert und das Lösungsmittel aus der überstehenden Lösung bzw. dem Niederschlag durch Destillation entfernt.

Ergebnis: Laktokinin war etwa zu 50 % in wassergesättigtem Äther gelöst.

In 80%igem Aceton und 80%igem Äthylalkohol ist Lk etwa zu 90% löslich.

In 80%igem Methanol fanden wir etwa 60% Lk, in 80%igem Butanol 50% gelöst.

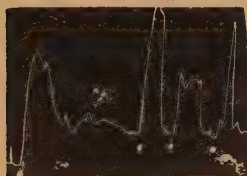
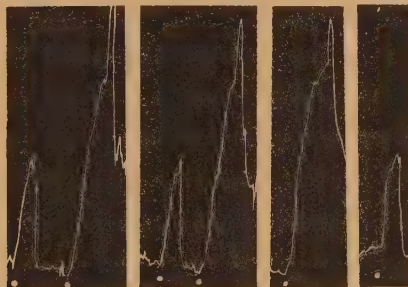


Abb.12

- 1= 1,0 ml eingeengtes Außendialysat geronnener Milch
- 2= 0,5 Gamma Histamin
- 3= 1,0 wie "1" + Äther, obere Ph.
- 4= 1,0 wie "1" + Äther, untere Ph.

1 2 3 4



1 2 3 4 5 6

Abb. 13

- 1= 0,1 Gamma Histamin
- 2= 0,5 ml Lk + Wasser
- 3= 0,1 Gamma Histamin
- 4= 0,5 ml Lk + Aceton (überstehende Lösung)
- 5= 0,5 ml Lk + Äthylalkohol (überstehende Lösung)
- 6= 0,1 Gamma Histamin

Pharmakologische und chemische Eigenschaften von Laktokinin.

Bei gleicher Aktivität am Meerschweinchendarm wirkt Lk am Blutdruck stärker als Histamin. Durch Aminoxydase (aus Erbsen), kristallisiertes Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin wird Lk nicht angegriffen. Wird eine Lk-Lösung mit NaNO_2 und Salzsäure erhitzt, so wird die Substanz völlig inaktiviert. Möglicherweise sind freie NH_2 -Gruppen für ihre Wirkung notwendig. Nach einstündigem Kochen der gereinigten Substanz ist ihre Aktivität verschwunden. Wird Lk mit 25%iger HCl 20 Stunden im kochenden Wasserbad gehalten und nach Entfernung der Salzsäure chromatographiert, so zeigt das Chromatogramm nach Ninhydrinbehandlung einen schwachen Fleck mit dem R_f -Wert von Lk und 5 weitere gut gegeneinander abgesetzte Flecke, während das Chromatogramm der gleichen, nicht hydrolysierten Substanzmenge nur eine kräftigen neben zwei sehr schwachen Flecken aufweist. Die Darmaktivität von Lk war nach der Säurebehandlung verschwunden. Danach könnte es sich bei der Substanz Lk um ein niederes Polypeptid handeln.

Zur Natur der Laktokinin-bildenden Bakterien.

Ein Hinweis auf die Natur der Lk-bildenden Mikroorganismen ergibt sich aus der Beobachtung, daß auch die Molke des handelsüblichen Yoghurt die glatte Muskulatur zur Kontraktion erregt. Nach E. R. Üresin sind die hauptsächlichsten Mikroorganismen, die zur Herstellung von Yoghurt verwendet werden, folgende:

- 1.) *Thermobakterium Bulgaricum*
- 2.) *Thermobakterium Yoghurt*
- 3.) *Streptococcus Thermophilus*.

Nach Üresin ist Yoghurt "ein Heilmittel gegen Arterienverkalkung, chron. Nierenentzündung, Leberkrankheiten und schlechte Verdauung." Die gegen Arterienverkalkung und schlechte Verdauung wirkenden Eigenschaften des Yoghurt könnten vielleicht auch auf die glatte Muskulatur erregende d. h. darmkontrahierende und blutdrucksenkende Wirkung unseres Laktokinins zurückgeführt werden.

Zur besseren Übersicht der bisherigen Versuche seien die Ergebnisse noch einmal kurz wiedergegeben:

Handelsübliche Frischmilch hat eine geringe darm- und uterus-erregende Wirkung. Am isolierten Meerschweinchendarm oder -Uterus entspricht die Aktivität von 1 ml frischer pasteurisierter Vollmilch etwa der von 0,01 Gamma Histamin. Läßt man die Milch gerinnen, so nimmt ihre Darmaktivität bis aufs 10 fache, bei monatelangem Stehen bis aufs 50 000 fache zu; bei narkotisierten Versuchstieren (Hund, Katze) i.v. injiziert, senkt die Molke rasch vorübergehend den Blutdruck. Die kontinuierliche Zunahme der pharmakologischen Aktivität der Milch ist auf den Stoffwechsel der in der Molke wachsenden Mikroorganismen zurückzuführen, da nach Zugabe von Antibiotica, wie Penicillin oder Terramycin (10 mg/1) die Entwicklung der Darmaktivität vollständig unterbunden wird. Ein Hinweis auf die Natur der Mikroorganismen, die die aktiven Substanzen entstehen lassen, ergibt sich aus der Beobachtung, daß auch die Molke des handelsüblichen Joghurt die glatte Muskulatur zur Kontraktion erregt.

Die pharmakologischen Wirkungen der Molke sind zu etwa 30% durch Histamin, der Hauptanteil durch eine Substanz verursacht, deren Anreicherung und Eigenschaften im Folgenden beschrieben wird. In Anlehnung an die Benennung von darmaktiven Substanzen, die aus tierischem Eiweiß fermentativ entstehen, bezeichnen wir sie als

"Laktokinin (Lk)". 1 Einheit Lk ist diejenige Menge, die am isolierten Meerschweinchendarm mit 1 Gamma Histamindichlorhydrat wirkungsgleich ist.

Anreicherung und Isolierung von Laktokinin, sowie Abgrenzung gegen Histamin.

Lk kann aus der Molke von 2 - 4 Monate im Kühlschrank ohne Desinfizienzen aufbewahrter Vollmilch auf folgende Weise angereichert werden: Dialyse der Molke in Cellophanbeuteln gegen das doppelte Volumen dest. Wasser, das nach je 24 Stunden 3 mal erneuert wird. Einengen der vereinigten Aussendialysate im Vakuum und in Stickstoffatmosphäre auf etwa $\frac{1}{3}$ des ursprünglichen Molkevolumens. (Einengung in Luftatmosphäre führt zu erheblichen Aktivitätsverlusten.) Fällung des Konzentrates mit dem 6 fachen Volumen Äthanol oder Aceton; Verwerfen des Niederschlags, Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum. Die so erhaltene wasserklare Lösung besitzt etwa 30 - 50% der Ausgangsaktivität und enthält neben Laktokinin noch Histamin. Zur Abtrennung des Histamins wird die hochaktive Molke bei p_H 10 3 x mit dem gleichen Volumen n-Amylalkohol ausgeschüttelt, wobei Lk in der wässrigen Phase verbleibt. Der Amylalkohol der wässrigen Phase wird mit Äther und dieser durch Evakuieren entfernt. In der verbleibenden Lösung entsprach 1 Einheit Lk rund 100 Gamma organischer Substanz. Ausbeute: etwa 70% der vor der Amylalkoholbehandlung vorhandenen Aktivität. Im aufsteigenden Papierchromatogramm (Schleicher Schüll Papier No 2043 b, Butanol-Eisessig-Wasser 80:20/20 als Lösungsmittel) fehlte bei 10 - 15 Ninhydrin positiven Zonen der für Histamin charakteristische Fleck. Zur weiteren Reinigung wurde das Lk-Rohpräparat aus der wässrigen, neutralisierten Lösung an den Kationenaustauscher Amberlite IRC-50

(Säule von 24:400 mm) adsorbiert, die Säule wurde dann mit dest. Wasser nachgewaschen und Lk mit 0,1 n NaOH eluiert. Der Durchbruch von Lk erfolgte dabei in einem scharfen Aktivitätsgipfel. Eine Einheit Lk entsprach 50 - 60 Gamma organischer Substanz.

Wie aus dem Papierchromatogramm hervorgeht, werden bei dem Austauschvorgang an Amberlite IRC-50 in der Hauptsache Substanzen mit niedrigem Rf-Wert zurückgehalten und damit aus der Lösung entfernt. Die aktiven Eluate wurden vereinigt und an einer Amberlite IR-4-B-Cl Säule (10:500 mm) weiter entwickelt. Es kam dadurch zur weitgehenden Abtrennung der restlichen Berleitsubstanzen, so daß im Durchlauf eine Lk-Lösung resultierte, die nach Papierchromatographie mit Butanol-Eisessig-Wasser und Ninhydrinfärbung sich als nahezu einheitlich erwies. Eine Einheit Lk entsprach jetzt 1 - 2 Gamma organischer Substanz. Rf-Wert von Lk: 0,12 (aufsteigendes Chromatogramm, Laufzeit 24 Stunden, Schleierpapier No 2043 b Lösungsmittel Butanol-Eisessig-Wasser 80:20:20), Rf-Wert von Histamin: 0,17. Wurden Lk und Histamin im Gemisch aufgetragen, so lagerte sich Histamin ("Imido Base") kaptenförmig über den oberen Rand des Lk-Fleckes. Lk gibt mit Ninhydrin einen dunkelroten Farbton, Histamin einen bläulichen.

II. Über die Entstehung einer uterusaktiven
Substanz bei Inkubation von Blutserum
mit Colostrum.

Inkubiert man Kuhmilch mit Blutserum bei Zimmertemperatur, so entsteht eine Substanz, die den isolierten Meerschweinchen- und Ratten- Uterus zur Kontraktion erregt; (Siehe dazu: Kurze Originalmitteilung E. Werle und F. Preisser Naturwissenschaften 1956, S. 376). Dieser Effekt kann jedoch nur in seltenen Fällen nachgewiesen werden. Wird frische Rindermilch mehrere Stunden lang unter Eiskühlung gegen stehendes, mit Terramycin versetztes Wasser dialysiert und versetzt man nach dem Einengen das Außendialysat mit Rinder serum, im Verhältnis 3:1, so ist im Ansatz nach etwa 30 Minuten eine den isolierten Meerschweinchenuterus kontrahierende Substanz nachweisbar.

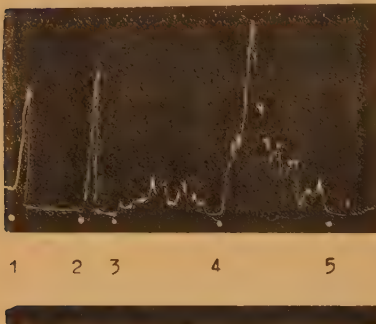


Abb. 1: Isolierter Meerschweinchenuterus, (3 cm lang, in 9 ml Thyrodelösung suspendiert, Hebelübertragung 1 : 4).

- 1 = 0,2 Gamma Histamin
- 2 = 0,2 " "
- 3 = 0,5 ml eingeengtes Außendialysat frischer Kuhmilch + Rinder serum (3:1)
- 4 = 1,0 ml wie 3
- 5 = 1,0 ml eingeengtes Außendialysat frischer Kuhmilch.

Doch war auch mithilfe dieses Vorgehens in vielen Fällen die uterusaktive Substanz nicht nachweisbar. Es wurde deshalb noch der folgende Weg eingeschlagen:

Frische Rindermilch wurde mit Essigsäure gefällt und der Niederschlag abzentrifugiert. Die saure überstehende Lösung wurde mit NH_3 neutralisiert. Um das Wachstum von Bakterien zu verhindern, wurde zur ü. L. Terramycin gegeben. Die so gewonnene klare Lösung ließen wir langsam durch eine Al_2O_3 -Säule laufen. Die 22 Fraktionen, die daraus hervorgingen, enthielten ab Fraktion 5 die Vorstufe unserer Substanz.



Abb. 2a: 1 = 1,0 Gamma Histamin
2, 3, 4, 5, = Fr. 1, 2, 3, 4 + Se. je 40 Min. nach Inkub.
6 = Fr. 5 + Se. 40 Min. nach Inkub.
7 = Fr. 5



Abb.2b:

8= Fr. 7 + SE /55 Min.

9= Fr. 7

10= Fr. 9 + SE /63 Min.

11= Fr.10 + SE /69 Min.

12= Fr. 11 + SE/75 Min.

13= Fr. 11

Auch beim zuletzt beschriebenen Vorgehen waren die Ergebnisse nicht einheitlich und nicht selten negativ. Die Menge der Vorstufe unserer uterusaktiven Substanz ist also in den verschiedenen untersuchten Milchen sehr variabel und wir mußten die Ursache dieser Tatsachen suchen.

Wir dachten an die Möglichkeit, daß das Rinderfutter eine Rolle spielen könnte, da wir ja unsere Milch aus der Molkerei bezogen und so natürlich eine Mischmilch aus verschiedenen Ställen und vielleicht auch Gegenden erhielten. Auch die Rasse der Rinder könnte für den verschieden hohen Gehalt der Vorstufe verantwortlich sein, ebenso wie der Zeitpunkt der Laktationsperiode, in dem sich die Kühe gerade befinden.

Zur Prüfung der zuletzt genannten Möglichkeit untersuchten wir die Milch einer Kuh, die 14 Tage vorher gekalbt hatte, also die Milch vom 14. Tag der Laktationsperiode. Die nicht vorbehandelte Milch wurde mit frischem Rinderserum im Verhältnis 3:1 inkubiert. Es entwickelte sich langsam eine uterusaktive Substanz, die nach etwa 60 Minuten ihre höchste Konzentration erreichte und nach 130 Min. (in späteren Versuchen erst nach 3-4 Stunden) wieder völlig verschwunden war (vgl. Abb. 3).

Dieses Ergebnis ließ vermuten, daß in der Milch, die kurz nach dem Kalben erzeugt wird, also im Colostrum, größere Mengen unserer Substanz enthalten sind, als in normaler Milch, was durch zahlreiche Versuche auch bestätigt wurde.

Abb. 3:

- 1= 0,5 ml des Inkubationsgemisches Milch (vom 14. Laktationstag) + frisches Rinderserum im Verhältnis 3:1, 20 Min. nach der Inkubation.
- 2= 1 nach 30 Min.
- 3= 1 " 0 "
- 4= 1 " 50 "
- 5= 1 " 70 "
- 6= 1 " 85 "
- 7= 1 " 100 "
- 8= 0,6 Gamma Histamin
- 9= 1 nach 130 Min.

Wir nehmen an, daß die Bildung und Inaktivierung der Substanz fermentativ erfolgt. Ihre Vorstufe findet sich im Colostrum, das freilegende Ferment im Serum. Im Folgenden wird das uterus-aktive Prinzip in Anlehnung an die Benennung von Substanzen ähnlicher Genese und Eigenschaften als „Colostrokinin“, die Vorstufe als „Colostrokininogen“, das Colostrokininogen spaltende Ferment des Serums als „Colostrokininogenase“ und das Colostrokinin inaktivierende Ferment als „Colostrokininase“ bezeichnet, wobei offen gelassen wird, ob es sich um spezifische Fermente handelt oder nicht.

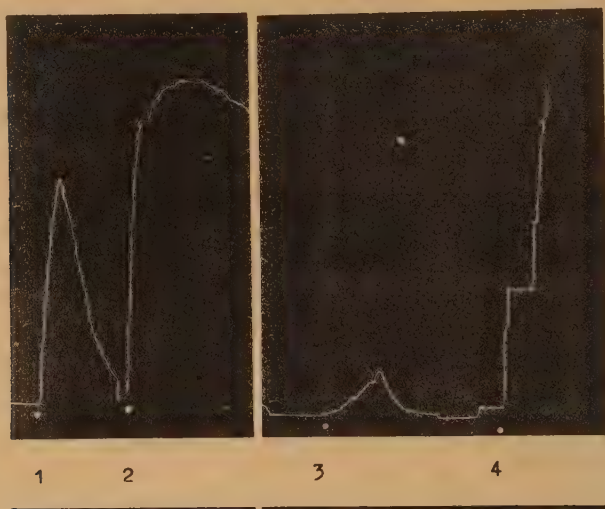
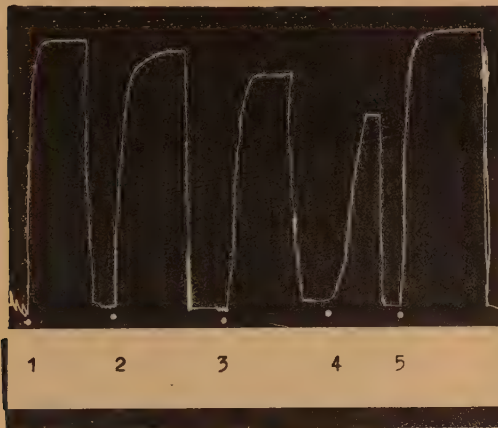


Abb. 4: 1= 0,3 Gamma Histamin
2= 0,5 ml Rindercolostrum + Rinderserum / 60 Min.
3= 0,5 ml Frauencolostrum + Rinderserum / 15 Min.
4= 0,5 ml Frauencolostrum + Rinderserum / 100 Min.

Außer Rinder-colostrum wurde auch Frauen- und Schweinecolostrum untersucht. Wie Abb. 4 zeigt, ist in Frauenmilch Colostrokininogen enthalten.

Schweinecolostrum (15 Std. nach dem Wurf abgenommen) war am Uterus stark eigenaktiv. 0,3 ml Schweinecolostrum entsprach in der Wirkung etwa 0,5 Gamma Histamin. Am isolierten Meerschweinchendarm bewirkten 0,5 ml Colostrum keine Kontraktion, obwohl sogar 0,2 Gamma Histamin wirksam waren. (Abb. 7).

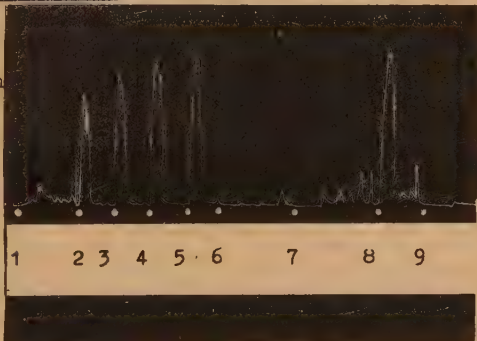
Abb. 6: Durch Schweinecolostrum erzeugte Kontraktionen am isolierten Meerschweinchenuterus.



- 1= 0,5 ml Schweinecolostr.
- + Rinderserum (3:1)/15'
- 2= 0,5 ml Schweinecolostr.
- 3= 0,3 ml Schweinecolostr.
- 4= 0,5 Gamma Histamin
- 5= 0,5 ml Schweinecolostr.
- + Rinderserum / 100 Min.

Abb. 7:
Kontraktionen eines isolierten Meerschweinchendarms.

- 1= 0,5 ml Schweinecolostrum
- 2=3=4=5= 0,2 Gamma Histamin
- 6= 0,3 ml Schweinecolostrum
- 7= 0,5 ml "
- 8= 0,2 Gamma Histamin
- 9= 0,5 ml Schweinecolostrum
- + Rinderserum / 60 Min.



Am narkotisierten Hund bewirkt Schweine- Rinder- und in geringerem Maße auch Frauencolostrum eine Blutdrucksteigerung und Amplitudenvergrößerung. Gekochtes Colostrum zeigt dieselbe Aktivität wie nicht gekochtes. Durch Inkubation mit Serum wird die Aktivität von Schweinecolostrum nur wenig gesteigert.



Abb. 8: Blutdruckkurve eines 21 kg schweren, narkotisierten Hundes.

- | | |
|---|---------------------------|
| 1= 0,2 ml Schweinecolostrum (15 Std. nach dem Wurf) | |
| 2= 0,15 ml " | |
| 3= 0,15 ml Kuhmilch (vom 14. Laktationstage) | |
| 4= 0,4 ml " | |
| 5= 0,2 ml Rindercolostrum | |
| 6= 0,5 ml " | 8= 0,5 ml Frauencolostrum |
| 7= 0,2 ml Frauencolostrum | 9= 1,0 ml " |

Abgrenzung von Colostrokinin gegen die Substanz "Serum + Wasser":

Wird Rinderserum mit Wasser verdünnt, so bildet sich ebenfalls eine uterusaktive Substanz. Wir wissen von dieser, daß sie schon etwa 10 Min. nach Inkubation von Wasser und Serum auftritt und rasch wieder verschwindet. Wie nebenstehende Abbildung belegt, vermag $H_2O + SE$ nach 120 Min. keine Kontraktion mehr zu erzeugen, während Colostrokinin noch voll aktiv ist.



- Abb. 9: 1=0,3 ml Colostrum 4=0,3 ml wie "2" nach 115'
 2=0,3 ml " (gek.ü.L.) + SE/107'
 3=0,3 ml " (" " "); 5=0,3ml $H_2O + SE/120'$

Für die Verschiedenheit der beiden Substanzen spricht auch die D a r m a k t i v i t ä t von $H_2O + SE$, Colostrokinin ist nur uterusaktiv. Abb. 9 zeigt außerdem, daß Colostrokininogen durch kurzes Kochen nicht zerstört wird.

Kann Colostrokinin einen trächtigen Uterus zur
Kontraktion bringen?

Colostrokinin ist auch am trächtigen Uterus wirksam. Im Versuch wurde das leere Horn eines nur einseitig belegten Uterus verwendet. Die Kurve zeigt nicht den üblichen glatten Verlauf, sondern klettert stufenförmig hoch.

Abb. 10: Leeres Horn eines isolierten, trächtigen Meerschweinchenuterus

1= 0,4 ml $H_2O + SE$

2= 0,5 ml Colostrokinin/120 Min.

3= 0,5 ml $H_2O + SE$



Für die Aktivität von Colostrokinin am trächtigen Uterus sprach auch folgender Versuch: In einem frisch geschlachteten Meerschweinchen fanden wir einen hochträchtigen Uterus vor. Wir nahmen den Uterus vorsichtig heraus und legten ihn in ein Thyrodebad von 37 Grad C. Durch das Bad wurde ständig Luft geleitet. Die äußere Form des Uterus veränderte sich dabei nicht. Zu der Thyrodelösung (30 ml) wurden nun 25 ml Colostrokinin/15 Min. gegeben. Nach 30 Minuten sah man eine deutliche Verkürzung und Verdickung des Uterus.

Nach 45 Min. wurden 35 ml der Bade Flüssigkeit entnommen und durch frisches Colostrokinin (25 ml) ersetzt. Am oberen Pol des Uterus (Trennungsstelle von Uterus und Eileiter) sah man nach etwa einer Stunde zwei ringförmige Wülste rund um den Uterus und eine deutliche Vergrößerung der Öffnung. In diesem Zustand blieb der Uterus längere Zeit; er wurde in ein frisches Thyrodebad gewechselt und wir versuchten die "Eröffnungsperiode" mit Oxytocin (3 Vögtlin-Einheiten ad 100 ml Thyrodelösung) zu beschleunigen. Daraufhin wurde der Uterus noch etwas kürzer und dicker, auch die Öffnung wurde noch etwas weiter; schließlich aber stand die Geburt wieder still. Auch 4 Einheiten Kallidin, ins Thyrodebad gegeben, änderten nichts mehr an dem Zustand. In der Annahme, daß der Uterus abgestorben war, wurde der Versuch abgebrochen.

Colostrokininogenase- und Colostrokininasekonzentration
im Schwangerenserum.

Wird Colostrum anstatt mit gewöhnlichem Menschenserum mit Schwangerenserum inkubiert (im Versuch mit Retroplacentarserum), so entsteht nur ganz wenig Colostrokinin. In Abb. 11 (nächste Seite) sehen wir Colostrum und Schwangerenserum (nach einer Inkubationszeit von 15, 40 und 140 Minuten gespritzt) nur zögernde und kleine Kontraktionen auslösen, während Colostrum und gewöhnliches Serum schon nach 30 Min. (ebenso nach 75 und 120 Min.) beachtliche Kontraktionen bewirken. Die Ursache dieser Erscheinung könnte ein verminderter Gehalt an Colostrokininogenase oder ein erhöhter Colostrokininasespiegel im Schwangerenserum sein. Auch könnte ein im Schwangerenserum auftretender dritter Stoff die Colostrokininbildung hemmen.



Abb. 11: Kontraktionen eines isolierten Meerschweinchen-uterus, ausgelöst durch:

- 1= 0,5 ml Colostrum + Retro-placent.SE / 15 Min.
- 2= 0,5 ml Col. + SE /30'
- 3= 0,5 ml Col.+ Retro-placent.SE/40 Min.
- 4= 0,5 ml Col. + SE/75'
- 5= 0,5 ml Col. + SE/120'
- 6= 0,5 ml Col. + Retro-plac.SE/140 Min.

Eine erhöhte Colostrokininasekonzentration im Schwangeren- bzw. Retroplacentarserum konnte in folgendem Versuch festgestellt werden: Ein uterusaktiver Colostrokininansatz wurde mit Retroplacentarserum inkubiert (35 Min. nach Inkubation von Col. + SE). Nach weiteren 35 Min. war die Aktivität unseres Ansatzes verschwunden. Die Möglichkeit einer Hemmung der Uteruskontraktion durch Schwangerenserum wurde ausgeschaltet, indem Schwangerenserum direkt in die Suspensionsflüssigkeit gespritzt wurde und dann, ohne das Bad vorher zu spülen, die Aktivität eines normalen Ansatzes geprüft.

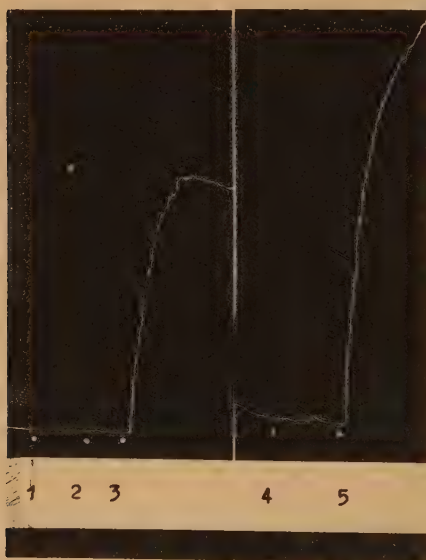


Abb. 12:

- 1= 0,3 ml Colostrokinin/70'
- + Retroplacent.SE/35 Min.
- 2= 0,1 ml Retropl.SE
- 3= Ohne "2" auszuspülen
- 0,3 ml Colostrokinin/77'
- 4= 0,3 ml Colostrokinin/90'
- + Retroplacent.SE/55 Min.
- 5= 0,3 ml Colostrokinin/95'

Damit ist bewiesen, daß die Colostrokininasekonzentration im Schwangerenserum höher ist, als im Normalserum

Die Konzentration von Colostrokininogenase kann nur dann bestimmt werden, wenn die Wirkung der Colostrokininase vorher ausgeschaltet wurde.

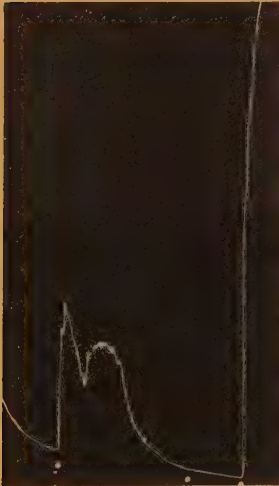


1

2

3

4



5

6

7



8

9

Dies konnte erreicht werden mit Äthylendiamintetraacetat. Wir benutzten das Handelspräparat "Trilon". Wie Abb. 13 zeigt, ist der Ansatz Colostrokinin + Retroplacentarserum schon nach 25 Min. weitgehend abgebaut, während Colostrokinin + Retroplacentarserum + Trilon noch nach 51 Min. voll aktiv ist.

Abb 13: Kontraktionen eines isolierten Meer-schweinchenuterus:

- 1= 0,2 ml Col.-kinin/40' + Retropl.SE/5'
- 2= 0,2 ml Col.-kinin/50' + Retropl.SE/15'
- 3= "2" nach 60 bzw.25'
- 4= 0,2 ml Col.-kinin/70' + Retropl.SE/-35' + Trilon/
- 5= 0,2 ml Col.-kinin/77' + Retropl.SE/42'
- 6= 0,2 mg Trilon
- 7= 0,2 ml Colostr.kin/86' + Retropl.SE/-51' + Trilon/
- 8= 0,2 Gamma Histamin
- 9= 0,5 Gamma Histamin.

Ein Inkubationsgemisch von Colostrum und Retroplacentarserum müßte eine normale Uterusaktivität entwickeln, wenn die Colostrokininase durch Trilon gehemmt wird und im Retroplacentarserum eine normal hohe Colostrokininogenasekonzentration vorausgesetzt wird. Wie Abb. 14 aber zeigt, wird in diesem Ansatz keine aktive Substanz gebildet, während Colostrum + Normalserum + Trilon schon nach 10 Minuten aktiv war. Wir müssen daher annehmen, daß die Colostrokininogenase im Retroplacentarserum vermindert ist.

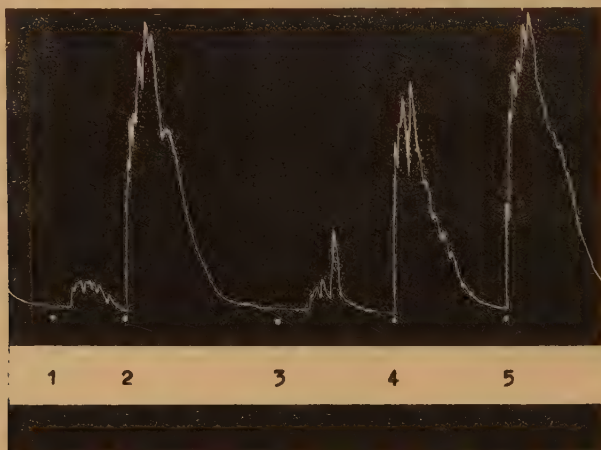


Abb. 14: Isolierter Meerschweinchenuterus.

1= 0,2 ml Colostrum + Retroplacentarserum + Trilon/ 25 Min.

2= 0,2 ml Colostrum + Normalserum / 100 Min.

3= 0,2 ml wie "1" nach 35 Min.

4= 0,2 ml wie "2" nach 125 Min.

5= 0,2 ml Colostrum + Normalserum + Trilon/ 10 Min nach
Inkubation

Die durch Trilon gehemmte Colostrokininase kann durch Ionen zweiwertiger Metalle teilweise reaktiviert werden. Von den verwendeten Metallionen Mg, Ca und Mn war Mn am wirksamsten.

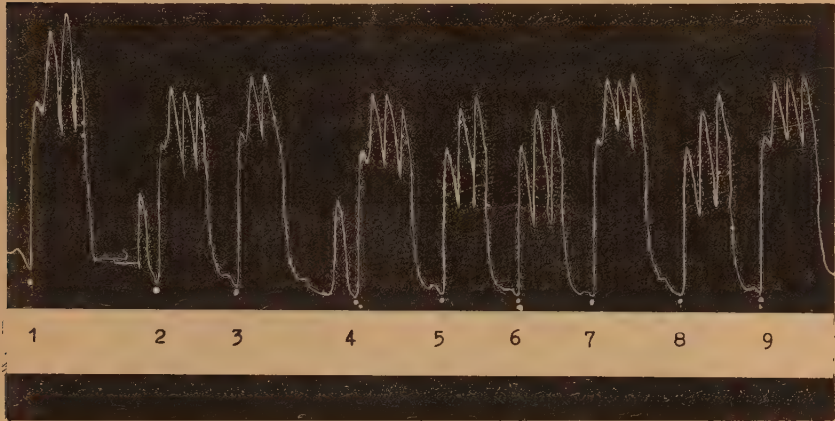


Abb. 15. Testobjekt: isolierter Rattenuterus.

1= 0,2 ml Colostrokinin/102 Min. + Retropl.SE + Trilon/62'

2= 0,2 ml Colostrokinin/110 Min. + Retropl.SE/70 Min.

3= 0,2 ml Colostrokinin/114 Min. + Retropl.SE + Trilon/74'

4= 0,2 ml " /120 " + " SE + " +Mg-ionen/80 Min.

5= 0,2 ml " /125 " + " SE + Trilon +Ca-ionen/85 Min.

6= 0,2 ml " /127 " + " SE + Trilon +Mn-ionen/87 Min.

7= 0,2 ml " /131 " + " SE + Trilon/91'

8= 0,2 ml " /135 " + Retropl.SE/95 Min.

9= 0,2 ml " /139 Min.

Schwangerenserum von mens 5 1/2, inkubiert mit Colostrum, entwickelt eine um die Hälfte schwächere Aktivität im Vergleich mit Normalserum. Die Colostrokininogenasekonzentration ist also im 6. Schwangerschaftsmonat vermindert, andererseits dürfte der Colostrokininasepiegel zu diesem Zeitpunkt schon erhöht sein, da nach Abb. 16 die Aktivität nach 112 Min. (5) bedeutend kleiner ist, als nach 90 Min. (2), während Colostrum + Normalserum nach dieser Zeit noch voll aktiv ist.

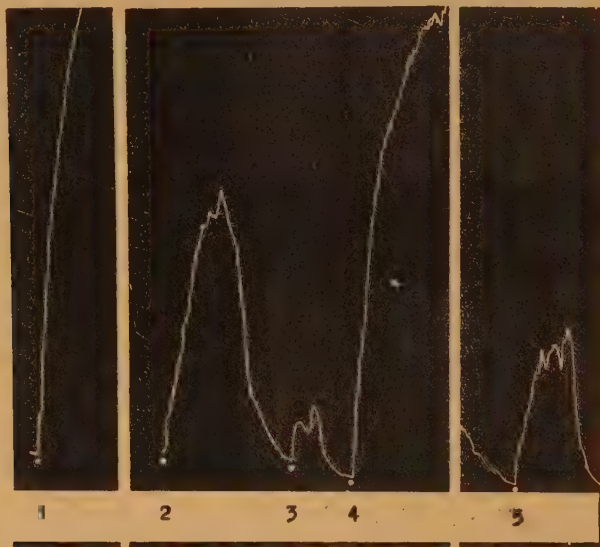


Abb. 16: Isolierter Meerschweinchenuterus.

1= 0,2 ml Colostrum + Normalserum/ 70 Min.

2= 0,2 ml " + Schwangerenserum mens 5 1/2 /90 Min.

3= 0,2 ml "

4= 0,2 ml wie "1" nach 100 Min.

5= 0,2 ml wie "2" nach 112 Min.

Schwangerenserum von mens 8 und Retroplacentarserum, inkubiert mit Colostrum, entwickeln nur noch kleine Mengen bzw. gar kein Colostrokinin mehr.

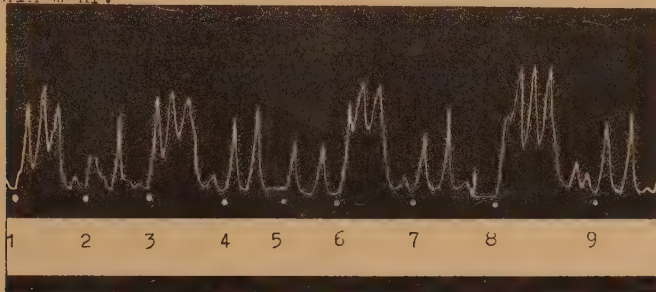


Abb. 17: Isolierter Rattenuterus.

- | |
|--|
| 1= 0,3 ml Colostrum + normales Menschenserum / 19 Min. |
| 2= 0,3 ml " + Schwangerenserum mens 8 / 23 Min. |
| 3= 0,3 ml " + normales Menschenserum / 26 Min. |
| 4= 0,3 ml " + Schwangerenserum mens 8 / 30 Min. |
| 5= 0,3 ml " + Retroplacentarserum / 30 Min. |
| 6= 0,3 ml " + normales Menschenserum / 36 Min. |
| 7= 0,3 ml " + Schwangerenserum mens 8 / 40 Min. |
| 8= 0,3 ml " + normales Menschenserum / 43 Min. |
| 9= 0,3 ml " + Retroplacentarserum / 48 Min. |

Post partum normalisieren sich die Verhältnisse sehr rasch wieder. Wie Abb. 18 (nächste Seite) zeigt, ist am 5. Wochenbett-Tag die Colostrokininasekonzentration im Serum wieder auf den normalen Wert abgesunken, der Ansatz ist nämlich nach 117 Minuten noch voll aktiv. Entsprechend ist am 5. Tag nach der Entbindung der Colostrokininogenasespiegel wieder zur Norm angestiegen.

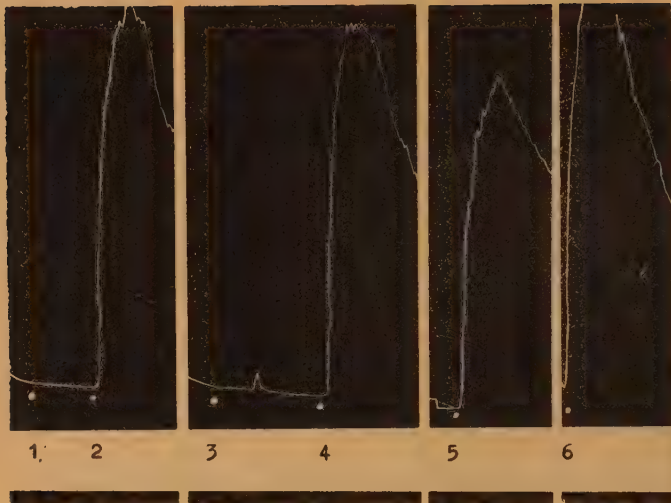


Abb. 18: Isolierter Meerschweinchenuterus.

1=	0,3 ml	Colostrum +	Wöchnerinnenserum (5. Tag)	/	10 Min.
2=	0,3 ml	"	"	/	65 "
3=	0,3 ml	"	"	/	22 "
4=	0,3 ml	"	"	/	77 "
5=	0,3 ml	"	+ normales Menschenserum	/	100 "
6=	0,3 ml	"	+ Wöchnerinnenserum (5. Tag)	/	117 "

Hemmung der Colostrokininase durch Parachlormercuri-
benzoesäure.

Colostrokininase, die wir im Schwangeren- bzw. im Retroplacentalserum festgestellt haben, wird außer durch "Trilon" auch durch Parachlormercuribenzoessäure gehemmt, sie muß also funktionell wichtige SH- Gruppen besitzen. Die Trilonhemmung deutet darauf hin, daß Colostrokininase Metallionen benötigt, um wirksam werden zu können. Möglicherweise handelt es sich bei dem Ferment um eine Peptidase.

Wir prüften zunächst, ob Parachlormercuribenzoessäure die durch Colostrokinin ausgelösten Uteruskontraktionen in irgend einer Weise beeinflusst. Wie Abb. 19 zeigt, ist dies nicht der Fall.

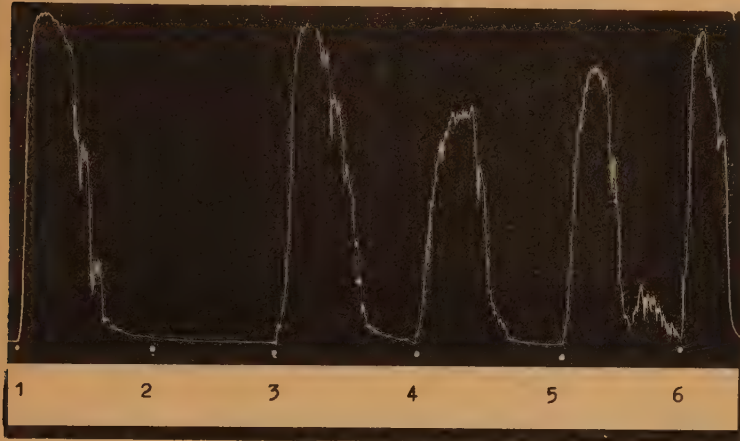


Abb. 19: Isolierter Meerschweinchenuterus.

- | | | | | | |
|--------|----------------|-------------|---|---------|--------------------------------|
| 1= 0,5 | Gamma Histamin | | | | |
| 2= 0,3 | ml Colostrum | | | | |
| 3= 0,3 | ml Colostrum + | Normalserum | / | 15 Min. | |
| 4= 0,3 | ml " + " | | / | 20 Min. | +Parachlormercuribenzoessäure |
| 5= 0,3 | ml " + " | | / | 30 Min. | |
| 6= 0,3 | ml " + " | | / | 35 Min. | +Parachlormercuribenzoessäure. |

Sodann inkubierten wir normales Serum mit Parachlormercuribenzoessäure, um nach 15 Min. die Wirksamkeit der Colostrokininogenase zu prüfen: wir beobachteten eine normale Colostrokininbildung. Schließlich wurde zu einem aktiven Colostrokininansatz Retroplacentalserum + Parachlormercuribenzoessäure gegeben. Während normalerweise Colostrokinin in 30 Min. durch Retroplacentalserum abgebaut wird, sehen wir hier (Abb.19a)nach 30 und 50 Minuten noch eine beachtliche Aktivität; der Abbau ist also zumindest verzögert.

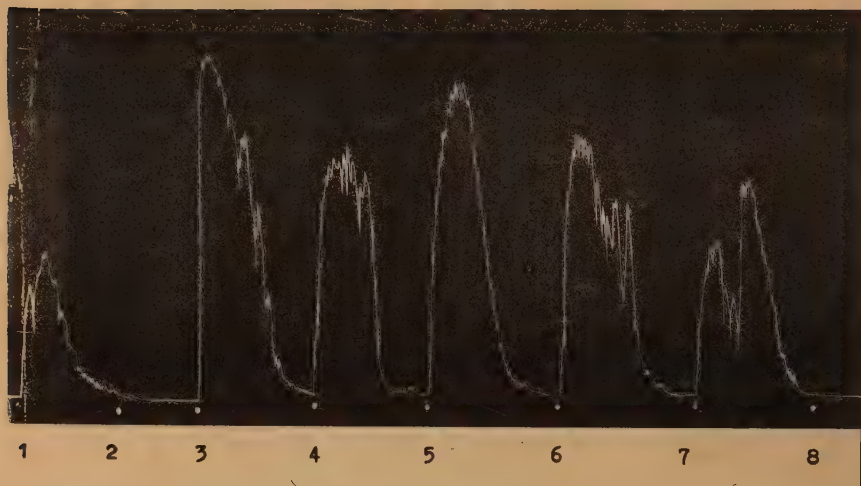


Abb 19a: Isoliertes Meerschweinchenuterus.

- 1= 0,3 ml Colostrum + (Serum+Parachlormercuribenzoessäure/15')/25'
- 2= 0,3 ml Colostrum
- 3= 0,3 ml Colostrum + (Serum+Parachlormercuribenzoessäure/15')/35'
- 4= 0,3 ml Colostrokinin
+ Retroplacent. SE + Parachlormercuribenzoessäure/30 Min.
- 5= 0,3 ml Colostrokinin + " " /60 "
- 6= 0,3 ml wie "1" nach 65 Min.
- 7= 0,3 ml wie "4" nach 50 Min.
- 8= 0,3 ml Colostrum+Serum / 0 Min.

Colostrokininase in der Placenta.

Colostrokininase kann auch in Placentarextract nachgewiesen werden.

Nach Abb. 20 erzeugt Colostrokinin, inkubiert mit Placentarextract, nach 75 Min. keine Kontraktion mehr.

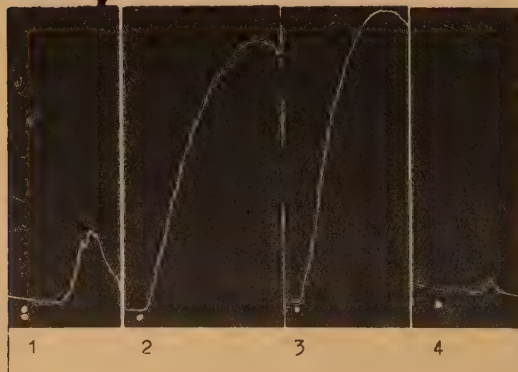


Abb. 20: Isoliertes Meerschweinchenuterus.

- 1= 0,3 ml Colostrum + Placentarextract/30 Min.
- 2= 0,3 ml Colostrokinin/101'
- 3= 0,3 ml " - /125'
- 4= 0,35" " /140'
+ Placent.-Extract / 75'

Charakterisierung der Colostrokininogenase.

Durch Dialyse von Serum gegen fließendes Wasser oder durch eine Stunde langes Erhitzen auf 56 Grad wird die Aktivität der Colostrokininogenase nicht vermindert.

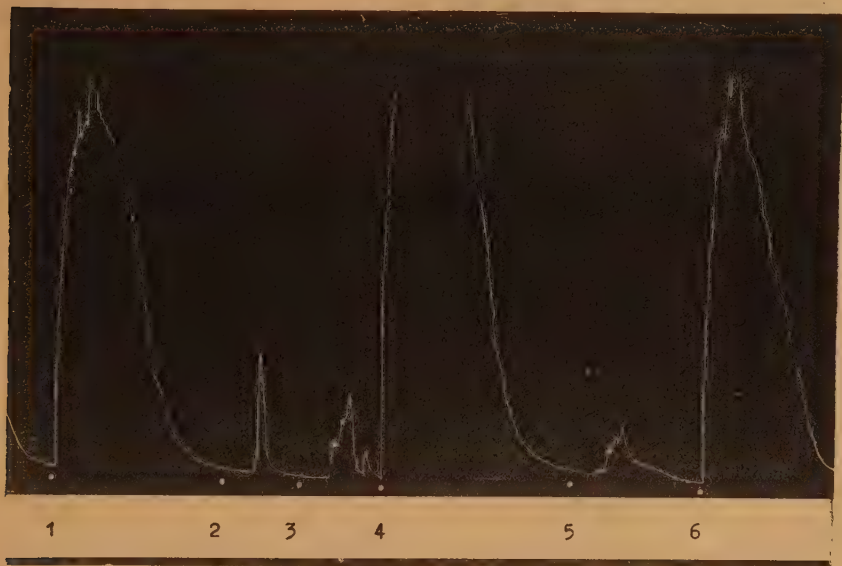


Abb. 21: Isolierter Meerschweinchenuterus.

1= 0,2 ml Colostrum + SE(1 Std. auf 56 Gr. erhitzt) / 30 Min.

2= 0,2 ml Colostrum

3= 0,2 ml H₂O + SE(1 Std. auf 56 Gr. erhitzt) / 45 Min.

4= 0,2 ml Colostrum + SE(1 Std. auf 56 Gr. erhitzt) / 45 Min.

5= 0,2 ml " + Retropl.SE(1 Std. auf 56 Gr. erh.)/25 Min.

6= 0,2 ml Colostrokinin / 60 Min.

10 und 15 Minuten lang gekochtes Serum, inkubiert mit Colostrum, entwickelt eine aktive Substanz, die sich von Colostrokinin durch eine längere Latenzzeit am Meerschweinchenuterus unterscheidet.

Außerdem ist diese Substanz nach 75 Min. inaktiv.

20 Minuten lang gekochtes Serum, inkubiert mit Colostrum, löst keine Kontraktion aus.

Abb. 22: Isolierter Meerschweinchenuterus.

1= 0,5 ml Colostrokinin/20 Min.

2= 0,5 ml " / 0 "

3= 0,5 ml Colostrum + Serum

(SE 10 Min. gekocht) /35 Min.

4= 0,5 ml Colostrum + Serum

(SE 15 Min. gekocht) /50 Min.

5= 0,5 ml Colostrum + Serum

(SE 20 Min. gekocht) /60 Min.

6= 0,5 ml Colostrokinin/65 Min.

7= 0,5 ml Colostrum

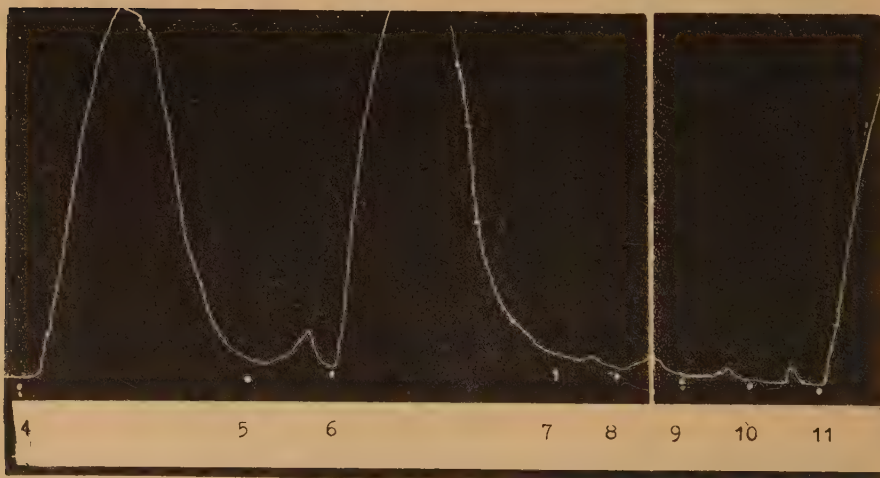
8= 0,5 ml Colostrokinin/ 0 Min.

9= 0,5 ml Colostrum + Serum

(SE 10 Min. gekocht) /75 Min.

10= 0,5 ml wie "4" /78 Min.

11= 0,5 ml Colostrokinin/82 Min.



Colostrokininbildung bei verschiedenen

p_H -Werten.

Abb. 23 und 24 zeigen Colostrokininbildung bei verschiedenen p_H -Werten. Wir stellten Colostrum auf p_H 1 - 13 ein und inkubierten dann mit Serum. Von p_H 4 - 8 gelingt die Colostrokininbildung. Die Kontraktion (Abb. 24) ist bei p_H 4 nur sehr schwach, sie steigt dann gleichmäßig an, erreicht bei p_H 7 ihren Höhepunkt und fällt dann sehr rasch wieder ab; sie ist bei p_H 9 = 0. Die Ansätze wurden vor dem Spritzen neutralisiert.

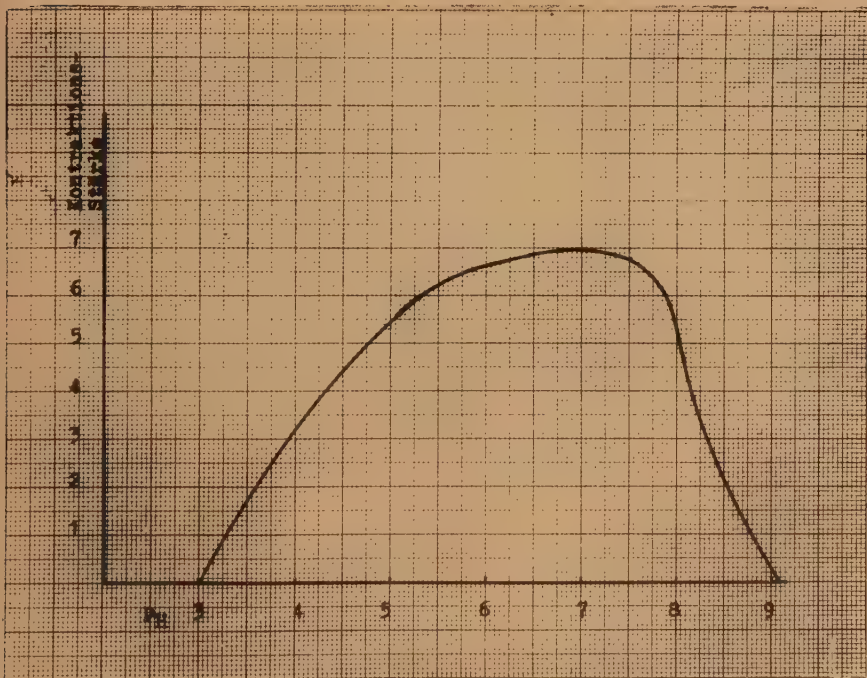


Abb. 23: Colostrokininbildung bei verschiedenen p_H -Werten, gemessen an der Stärke der Kontraktionen eines isolierten Meerschweinchenuterus.

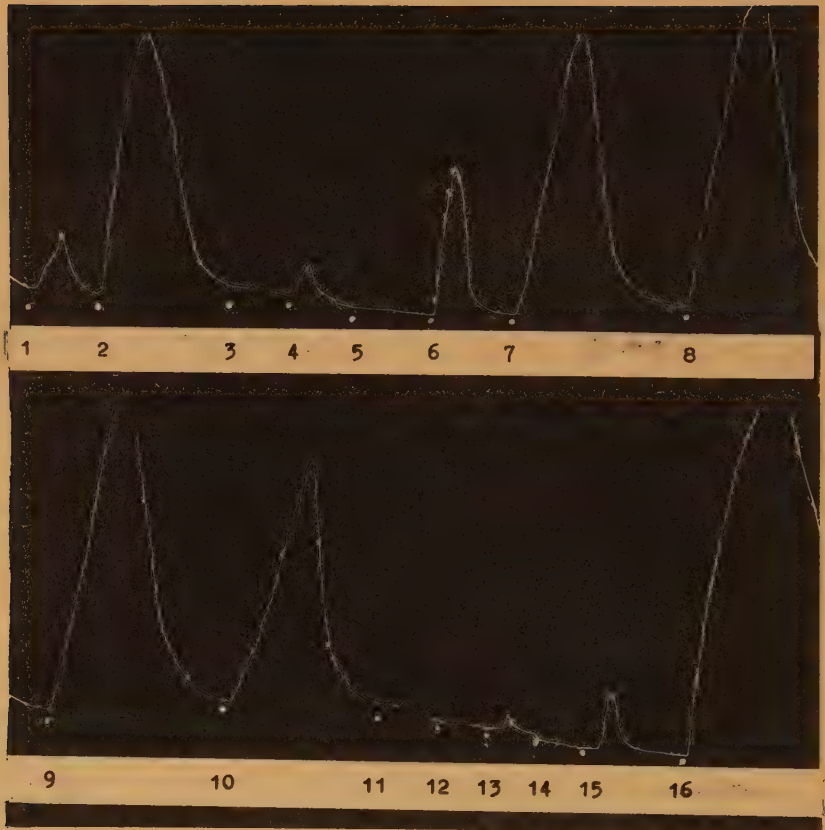


Abb. 24: Kontraktionen eines isolierten Meerschweinchenuterus.

1=	1,0 ml	Colostrum	pH	7	+	Serum	/	0 Min.
2=	1,0 ml	"	"	7	+	"	/	71 Min.
3=	1,0 ml	"	"	1	+	"	/	77 Min.
4=	1,0 ml	"	"	2	+	"	/	79 Min.
5=	1,0 ml	"	"	3	+	"	/	82 Min.
6=	1,0 ml	"	"	4	+	"	/	85 Min.
7=	1,0 ml	"	"	5	+	"	/	88 Min.
8=	1,0 ml	"	"	6	+	"	/	97 Min.
9=	1,0 ml	"	"	7	+	"	/	105 Min.
10=	1,0 ml	"	"	8	+	"	/	113 Min.
11=	1,0 ml	"	"	9	+	"	/	120 Min.
12=	1,0 ml	"	"	10	+	"	/	122 Min.
13=	1,0 ml	"	"	11	+	"	/	124 Min.
14=	1,0 ml	"	"	12	+	"	/	126 Min.
15=	1,0 ml	"	"	13	+	"	/	128 Min.
16=	1,0 ml	"	"	7	+	"	/	133 Min.

Anreicherung des Colostrokininogens.

Der Versuch, Colostrokininogen durch Dialyse von Colostrum gegen stehendes Wasser und nachfolgendes Einengen des Außendialysates anzureichern, ist mit zu großen Substanzverlusten verbunden. Wir versuchten daher, das Colostrum mit verschiedenen Fällungsmitteln zu enteiweißen: Colostrum wurde (wie früher normale Milch) mit Essigsäure versetzt, der Niederschlag abzentrifugiert und die überstehende Lösung neutralisiert. Nach Inkubation mit Serum ergab sich, daß bei dieser Behandlung etwa die Hälfte des Colostrokininogens zerstört wurde. Bei der Fraktionierung der erhaltenen Lösung an einer Säule von Aluminiumoxyd "Brockmann" ging nochmal 50% Colostrokininogen verloren. So ist also auch dieser Reinigungsweg mit zu hohen Verlusten belastet und daher nicht gangbar.

Auch bei anderen Fällungsmitteln wie z. B. 10%ige Trichloressigsäure, Alkohol, Aceton und Äther (bei verschiedenen p_H Werten) waren die Verluste zu groß, sodaß nach anderen Reinigungsmethoden gesucht werden mußte.

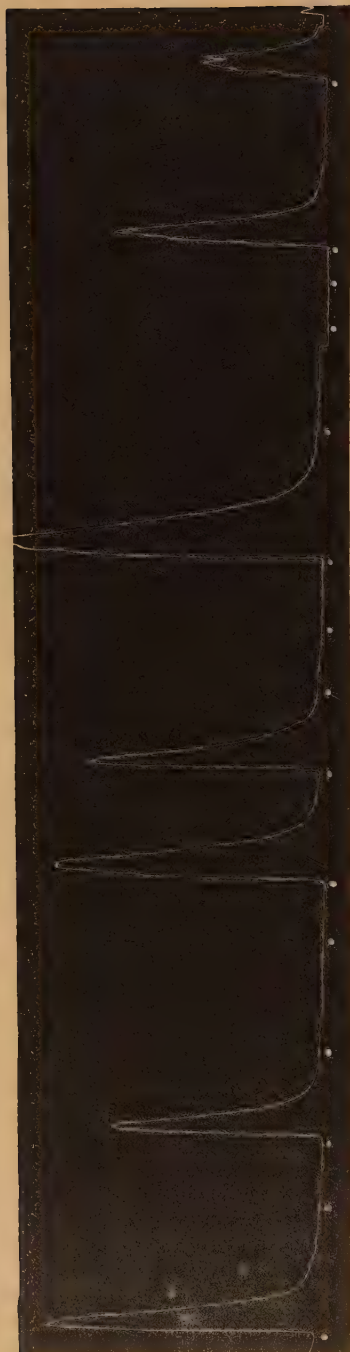


Abb. 25: Isolierter Meerschweinchenuterus.

1= 0,3 ml Colostrokinin

2= 0,3 ml Colostrum

3= 0,5 ml Colostrum(mit Essigsäure
enteiweißt ü.L.) + SE /75'

4= 0,5 ml H₂O + Serum

5= 0,5 ml wie "3" nach 84 Min.

6= 0,3 ml Colostrokinin / 87'

7= 0,7 ml wie "3" nach 92 Min.

8= 0,7 ml H₂O + Serum

9= 0,7 ml Colostrum(mit Essigsäure
enteiweißt ü. L.)

10= 0,7 ml wie "3" nach 105 Min.

11= 0,4 ml wie "3" nach 110 Min.

12= 0,5 ml Colostrum (mit Essigsäure
enteiweißt ü. L.) fraktioniert an Aluminiumoxyd-
Säule (Fr.7) + Serum /15 Min.

13= 0,3 Gamma Histamin

14= 0,5 Gamma Histamin

15= 0,7 ml wie "12" nach 33 Min.

Eine Anreicherung von Colostrokininogen auf etwa das 50 fache gelang aber mit Hilfe von Amberlite IR-4-B mit einer Ausbeute von rund 50%. Dazu wurde der wasserfeuchte Amberlite mit Colostrum im Verhältnis 1:1 (v/v) im Becherglas verrührt. Nach 120 Minuten wurde der Amberlite abzentrifugiert und mit destilliertem Wasser auf der Zentrifuge ausgewaschen. Im H_2O - und NaOH-Eluat war Colostrokininogen nicht festzustellen. Mit 0,1n Salzsäure dagegen konnte es fast vollständig eluiert werden. Das Eluat enthielt 60 - 80 Gamma organische Substanz / ml. Im aufsteigenden Papierchromatogramm mit Butanol- Eisessig- Wasser (80:20:20), Laufzeit 24 Stunden, ergaben sich 3 Ninhydrin-positive Flecke von niedrigem R_f -Wert. Die angereicherte Substanz erwies sich bei Aufbewahrung, selbst bei 0 Grad, nur etwa 24 Stunden beständig. An Amberlite IR-4B adsorbiert, war sie aber auch bei Zimmertemperatur mehrere Tage haltbar. Wir suchten daher nach einer Substanz, an die Colostrokininogen - ähnlich wie an Amberlite IR-4B - gebunden wird, um so eine größere Stabilität zu erreichen. Wir versuchten es mit einer basischen Aminosäure wie Arginin und mit "Kalignost", konnten aber zu keinem positiven Ergebnis gelangen.

In gleicher Weise wie Colostrokininogen wurde auch Colostrokinin an Amberlite IR-4B adsorbiert. Wie Abb. 27 zeigt, ist nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten keine Aktivität mehr festzustellen, während Colostrokinin nach 135 Minuten noch voll aktiv ist.

Charakterisierung von Colostrokinin.

Wurden aktive Colostrokininansätze bei p_H 1 - 13 fünf Minuten lang gekocht, so wurde folgendes festgestellt: Bei p_H 5 - 8 war Colostrokinin zerstört; in stärker saurem Gebiet entwickelte sich eine neue aktive Substanz, und zwar bei p_H 3 und 4 am stärksten. Bei p_H 8 und 9 entstand eine eben feststellbare Aktivität, (s. Abb. 28).

Abb. 28: Kontraktionen eines isolierten Rattenuterus.

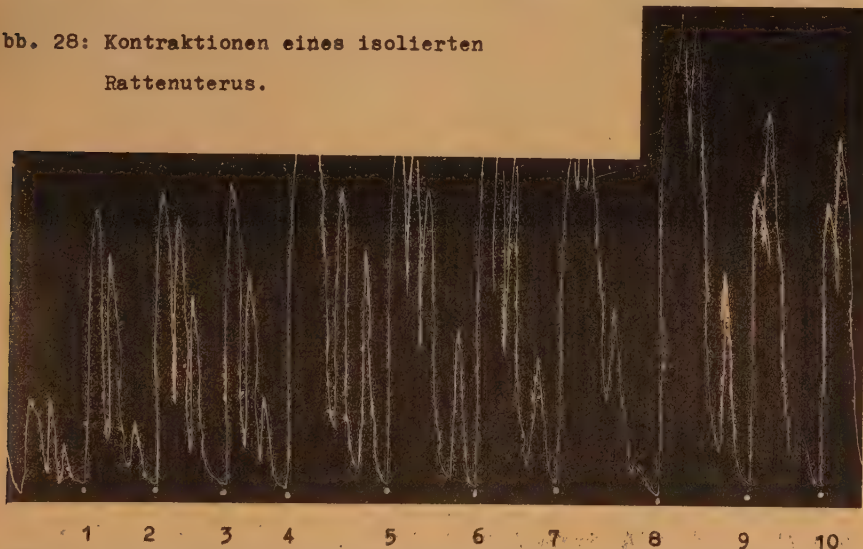


Abb. 28

1= 1,0 ml	Colostrokinin/180 Min.	bei p_H 6	fünf Minuten lang gekocht.
2= 1,0 ml	"	" " 7	" " " "
3= 1,0 ml	"	" " 5	" " " "
4= 1,0 ml	Colostrokinin/180 Min.	"	"
5= 0,5 ml	"	" " 1	" " " "
6= 0,5 ml	"	" " 2	" " " "
7= 0,5 ml	"	" " 3	" " " "
8= 0,5 ml	"	" " 3	" " " "
9= 0,5 ml	"	" " 1	" " " "
10= 0,5 ml	"	" " 4	" " " "

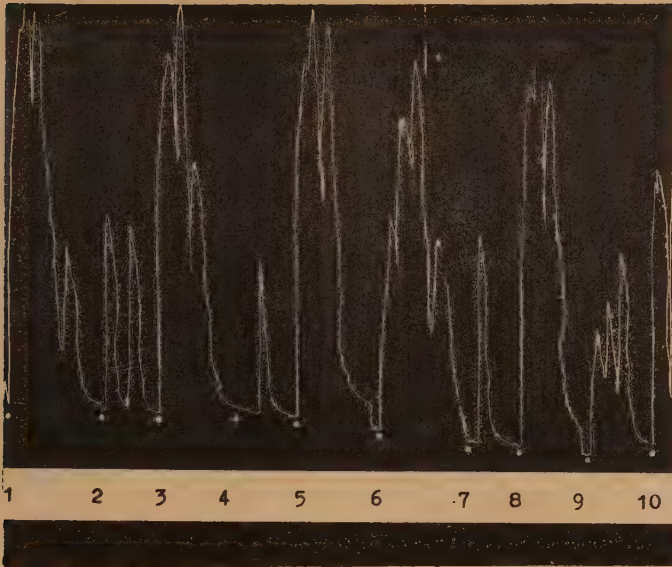


Abb. 29: Abbau der in Abb. 28 gezeigten uterusaktiven Substanz
durch Placentarextract und Normalserum.

- 1= 0,5 ml Colostrokinin/180 Min. bei p_{H3} fünf Minuten lang gekocht.
- 2= 0,5 ml wie "1" + Placentarextract / 12 Min.
- 3= 0,3 ml wie "1"
- 4= 0,5 ml wie "1" + Placentarextract / 18 Min.
- 5= 0,2 ml Placentarextract + (ohne das Bad vorher zu spülen)
0,3 ml wie "1"
- 6= 0,5 ml Colostrokinin / 40 Min.
- 7= 0,5 ml Colostrum + Serum / 0 Min.
- 8= 0,5 ml wie "1" + Normalserum / 10 Min.
- 9= 0,5 ml wie "1" + Normalserum / 22 Min.
- 10= 0,5 ml wie "1" + Normalserum / 25 Min.

Zur Abgrenzung der Colostrokininase von Oxytocinase wurde versucht,

die Oxytocinase durch Chinin oder Follikelhormon zu hemmen. Wir gingen von der Vorstellung aus, daß bei Einleitung oder Beschleunigung einer Geburt Oxytocin und Chinin kombiniert als Wehenmittel angewendet werden und das Chinin im oben genannten Sinne die Wirkung von Oxytocin verstärken soll.

Ansätze: Ia) 0,1 VE Oxytocin + 1 mg Chinin + 1 ml Normalserum
 IIa) 0,1 VE " + 1 mg " + 1 ml Retroplac. SE.
 IIIa) 0,1 VE " + 1 ml Retroplacentarserum

Aus Abb. 30 ist zu ersehen, daß Chinin die Wirkung der Oxytocinase in keiner Weise beeinflusst.

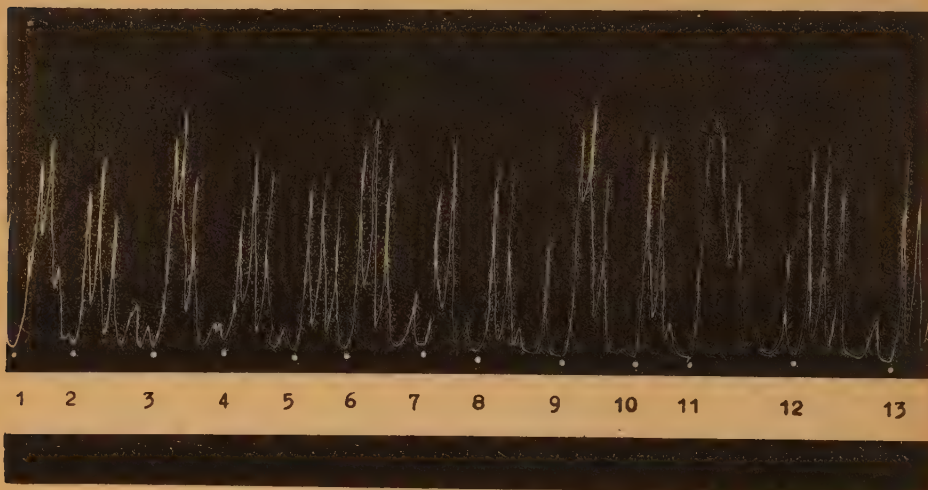


Abb. 30: Isolierter Rattenuterus.

1= 0,008 VE Oxytocin	8= 0,2 ml Ansatz IIIa /37 Min.
2= 0,1 ml Ansatz Ia /12 Min.	9= 0,4 ml " IIIa /41 "
3= 0,2 ml " Ia /16 "	10= 0,4 ml " IIa /45 "
4= 0,2 ml " IIa /19 "	11= 0,3 ml " Ia /48 "
5= 0,2 ml " IIIa /27 "	12= 0,3 ml " IIa /55 "
6= 0,2 ml " Ia /31 "	13= 0,3 ml " IIIa /60 "
7= 0,2 ml " IIa /34 "	

Dasselbe Ergebnis lieferten die Ansätze:

Ib) 1 VE Oxytocin + 1 mg Ovocyclin + 1 ml Normalserum

IIb) 1 VE " + 1 mg " + 1 ml Retroplacentarserum

IIIb) 1 VE " + 1 ml H₂O + 1 ml "

Die Ansätze wurden vor dem Spritzen bis 0,1 VE Oxytocin pro ml verdünnt.

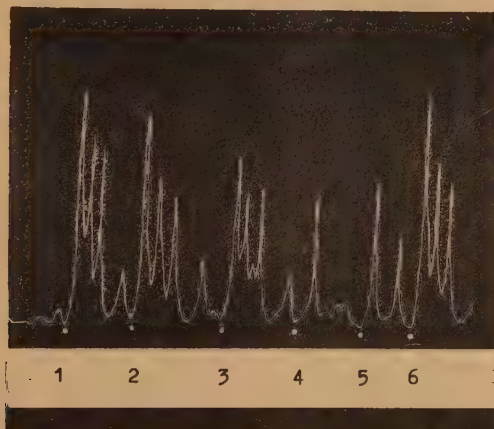


Abb. 31: Isolierter Rattenuterus.

1= 0,02 VE Oxytocin

2= 0,01 VE " + Menschenserum (1 ml SE zu
1 VE Oxytocin)

3= 0,2 ml Ansatz Ib /111 Min.

4= 0,2 ml " IIb /115 "

5= 0,2 ml " IIIb /118 "

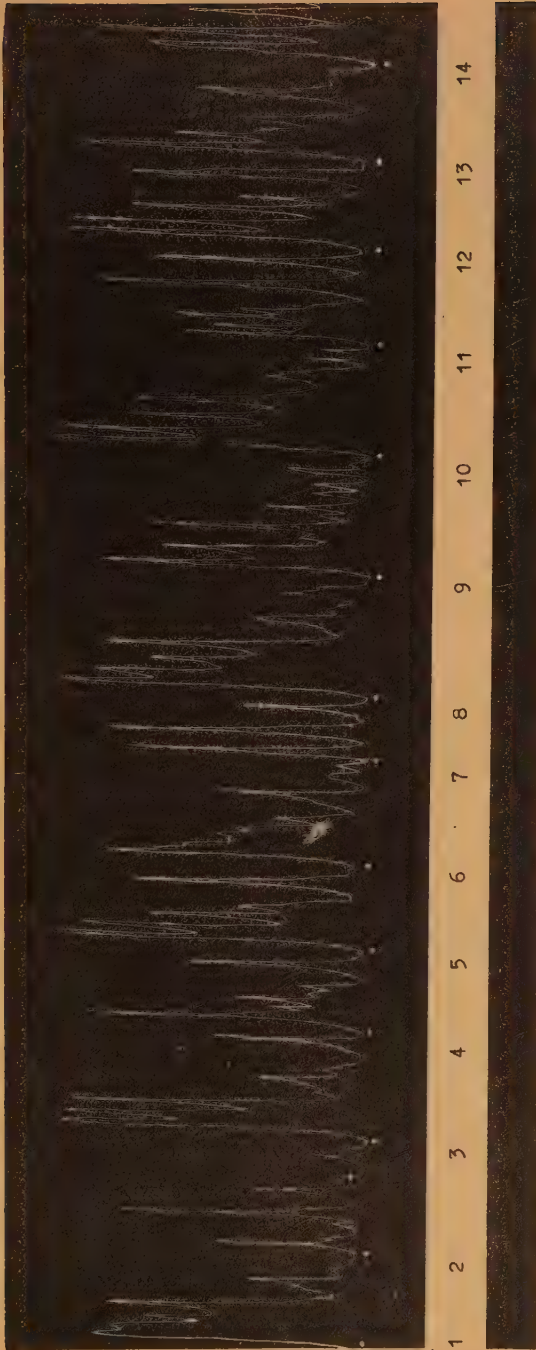
6= 0,2 ml " Ib /120 "

Die Colostrokininogen-Konzentration an verschiedenen Tagen zu Beginn der Laktationsperiode wurde bestimmt, indem am 2., 4., 6., 8., 10. und 12. Tag post partum Colostrum abgenommen und in gefrorenem Zustand bis zur Verwendung aufbewahrt wurde. Nach Inkubation mit Serum im üblichen Verhältnis 3:1 konnte ab "Colostrum 4. Tag" post partum eine Colostrokininbildung festgestellt werden. Die Colostrokininogenkonzentration steigt dann bis zum 6. - 8. Tag post partum an und wird am 12. Tag wieder etwas kleiner. Am 2. Tag post partum konnte keine Aktivität nachgewiesen werden; die Ursache dafür ist wahrscheinlich an der zu geringen Empfindlichkeit des eingespannten Rattenuterus zu suchen, denn bei früheren Versuchen wurde auch schon am 2. Tag nach Laktationsbeginn Colostrokininogen nachgewiesen.

Abb. 32 (nächste Seite): Kontraktionen eines isolierten Ratten-
uterus, ausgelöst durch:

- 1= 0,0006 VE Oxytocin
- 2= 0,7 ml Colostrum (vom 2. Tag post partum) + Serum / 50 Min.
- 3= 0,0006 VE Oxytocin
- 4= 0,7 ml Colostrum (" 4. " " ") + " / 60 Min.
- 5= 0,0006 VE Oxytocin
- 6= 0,7 ml Colostrum (" 6. " " ") + " / 68 Min.
- 7= 0,7 ml Colostrum
- 8= 0,0006 VE Oxytocin
- 9= 0,7 ml Colostrum (" 8. " " ") + " / 83 Min.
- 10= 0,0006 VE Oxytocin
- 11= 0,7 ml Colostrum (" 12. " " ") + " / 95 Min.
- 12= 0,0006 VE Oxytocin
- 13= 0,7 ml Colostrum (" 10. " " ") + " / 104 Min.
- 14= 0,7 ml Colostrum (" 4. " " ") + " / 110 Min.

Abb. 32.



Veränderung der Milcheiweißkonzentration beim Übergang von
Colostrum in normale Milch.

R. Nesenl und H. Körprich haben die Veränderung der Milcheiweißkonzentration beim Übergang von Colostrum in normale Milch untersucht und folgende Tabelle aufgestellt (aus "Die Milchwissenschaft" Jg. 2 1947).

Tabelle I :

Zeit nach dem Kalben:	Gesamt N-haltige Subst. in %:	Casein in %:	Alb. Glob. in %:
0 Std.	23,14	5,57	16,92
12 "	13,73	4,47	8,98
24 "	7,11	4,23	2,63
36 "	5,96	4,08	1,64
48 "	5,40	3,91	1,23
60 "	4,89	3,62	1,08
72 "	4,77	3,55	1,06
96 "	4,31	3,30	0,90
5. Tg.	3,90	3,12	0,69
6. "	3,56	2,76	0,75
12. "	2,85	2,22	0,54

Weiterhin haben die Autoren "die prozentuale Veränderung der Inhaltsstoffe der Kuhmilch mit zunehmender Laktationszeit" untersucht.

Tabelle II:

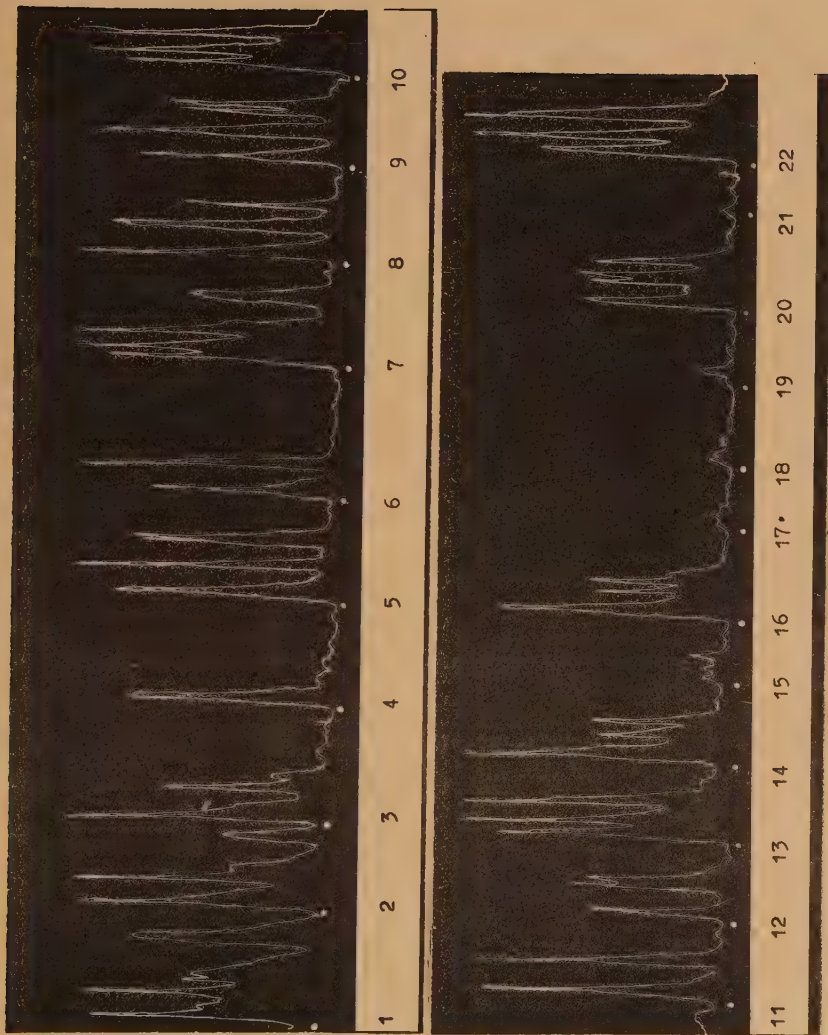
Lakt.-zeit in Tagen	Fett M=3,74%		Gesamt-N M=468mg%		Casein- N M=359mg%		Alb.Glob.-N M= 81 mg %	
	abs.%	rel.%	abs.%	rel.%	abs.%	rel.%	abs.%	rel.%
12-25	3,58	95,7	569	121,6	410	114,2	123	151,9
26-50	3,53	94,4	455	97,2	343	95,5	81	100,0
51-75	3,45	92,2	406	86,8	312	86,9	72	88,9
75-100	3,54	94,7	435	92,9	335	93,9	73	90,1
101-125	3,51	93,9	438	93,6	335	93,9	73	90,1

Lakt.zeit in Tagen:	Fett M=3,74%		Gesamt-N M=468mg%		Casein-N M=359mg%		Alb.Glob.-N M=81mg%	
	abs.%	rel.%	abs.%	rel.%	abs.%	rel.%	abs.%	rel.%
126-150	3,58	95,7	454	97,0	347	96,7	61	75,3
151-175	3,62	96,8	464	99,1	359	100,0	78	96,3
176-200	3,67	98,1	470	100,4	353	98,3	84	103,7
201-225	3,74	100,0	450	96,2	354	98,6	76	93,8
226-250	3,84	102,7	463	98,9	356	99,2	81	100,0
251-275	3,26	86,9	481	102,8	374	104,2	81	100,0
276-300	3,76	100,5	466	99,6	355	98,9	80	98,7
301-325	3,60	96,3	465	99,4	356	99,2	81	100,0
326-350	3,73	99,7	461	98,5	353	98,3	79	97,5
351-375	3,91	104,6	498	106,4	375	104,4	96	118,5
376-400	4,13	110,4	488	104,3	384	107,0	75	92,6
401-425	4,27	114,2	519	110,9	409	113,9	81	100,0
426-450	4,50	120,3	542	115,8	425	118,4	89	109,9
451-475	4,45	119,0	570	121,9	445	124,0	94	116,1
476-500	4,85	129,7	514	109,8	405	112,8	82	101,2
501-525	5,83	155,9	647	138,2	497	138,4	127	156,8

Tabelle II zeigt, daß gegen Ende der Laktationszeit die Milch wieder biestmilchähnlichen Charakter annimmt. Es lag daher nahe, in der Milch, die kurz vor dem Trockenstellen der Kühe gewonnen wird, nach Colostrokininogen zu suchen. Es wurden Milchen von den Kühen "Alma" und "Liesa" verwendet, die beide 35 Wochen trächtig und damit kurz vor dem Trockenstellen waren. In keinem Fall konnte Colostrokininogen festgestellt werden.

Abb.33: Kontraktionen eines isolierten Rattenuterus.

- 1= 0,002 VE Oxytocin
- 2= 0,002 VE "
- 3= 0,5 ml Milch "Alma" + Ri.-SE / 26 Min.
- 4= 0,5 ml " "Liesa"+ " / 33 Min.
- 5= 1,0 ml " "Alma" + " / 38 "
- 6= 1,0 ml " "Liesa"+ " / 43 "
- 7= 0,003 VE Oxytocin
- 8= 1,0 ml Milch "Alma" + " / 55 "
- 9= 1,0 ml " "Liesa"+ " / 60 "
- 10= 0,003 VE Oxytocin
- 11= 1,0 ml Milch "Alma" + " / 82 "
- 12= 1,0 ml " "Liesa"+ + / 86 "
- 13= 0,003 VE Oxytocin
- 14= 1,0 ml Colostrum (6. Tag post partum) + Ri.-SE / 25 Min.
- 15= 1,0 ml " (" " " ")
- 16= 1,0 ml " (" " " ") + Ri.-SE / 32 Min.
- 17= 1,0 ml " (" " " ")
- 18= 1,0 ml Milch "Alma" + Ri.-SE / 115 Min.
- 19= 1,0 ml " "Liesa"+ " " / 119 "
- 20= 1,0 ml Colostrum (6. Tag post partum) + Ri.-SE / 48 Min.
- 21= 1,0 ml " (" " " ")
- 22= 0,003 VE Oxytocin



o. 33. Kontraktionen eines isolierten Rattenuterus.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

Wird bei Zimmertemperatur Colostrum von Frauen oder Colostrum der Kuh mit Blutserum inkubiert, so wird eine Substanz entwickelt, die den isolierten Uterus von Meerschweinchen oder Ratten zur Kontraktion erregt; am isolierten Darm dieser Tiere sind stark uterusaktive Ansätze unwirksam. Die Uterus-Aktivität der Ansätze nimmt mit der Inkubationszeit bis zu einem Maximum, das nach etwa 30 - 80 Minuten erreicht wird, zu und dann langsam wieder ab. Wir nehmen an, daß die Bildung und Inaktivierung der Substanz fermentativ erfolgt. Ihre Vorstufe findet sich im Colostrum (in sehr geringer Konzentration auch in der handelsüblichen Kuhmilch), das freilegende Enzym im Serum. Im Folgenden wird das uterusaktive Prinzip in Anlehnung an die Benennung von Substanzen ähnlicher Genese und Eigenschaften als Colostro-Kinin, die Vorstufe als Colostro-Kininogen, das Colostro-Kininogen spaltende Enzym des Serums als Colostro-Kininogenase und das Colostro-Kinin inaktivierend Ferment als Colostro-Kininase bezeichnet, wobei offen gelassen wird, ob es sich um spezifische Fermente handelt oder nicht.

A.) Nachweis der Colostrokininogenase im Serum.

Zur Freilegung von Colostrokinin sind frische Seren von Menschen und Rindern geeignet; sie sind unter Toluol im Eisschrank oder in eingefrorenem Zustand aufbewahrt mindestens 8 Tage lang verwendbar. Die höchsten Ausbeuten an Colostrokinin werden bei Inkubation artgleicher Colostrum-Serungemische erhalten. Günstigstes Mengenverhältnis: 3 ml Colostrum + 1 ml Serum. Das Optimum der Colostrokininogenspaltung liegt bei p_H 7. Nach dem sauren und

alkalischen Bereich hin nimmt die Spaltungsgeschwindigkeit, gemessen an der Colostrokininausbeute, ab. Unterhalb $p_H 4$ und oberhalb $p_H 8,5$ wird Colostrokinin nicht freigesetzt.

Wird Colostrum mit Serum gravider Frauen inkubiert, so wird wenig oder kein Colostrokinin entwickelt. Durch Serum mens IV oder V wird nur etwa die Hälfte der im Ansatz mit Serum von Nichtgraviden auftretenden Menge Colostrokinin freigesetzt. Bei Verwendung von Serum mens VIII oder IX, sowie von Retroplacentarserum wird keine Colostrokininbildung beobachtet. Serum vom 3.-4. Tage nach dem Partus entwickelt aus Colostrum normale Mengen von Colostrokinin. Diese Verminderung der Ausbeute an Colostrokinin könnte auf einer Abnahme der Konzentration der Colostrokininogenase oder einer Zunahme der Colostrokininase im Schwangeren-Serum beruhen. Nach unseren Feststellungen nimmt die Aktivität der Colostrokininase im Laufe der Schwangerschaft zu, die der Colostrokininogenase ab. Die Aktivität beider Fermente kehrt nach dem Partus innerhalb von 3 - 4 Tagen wieder auf ihren Normalwert zurück.

Die Colostrokininase wird durch p-Chlormercuribenzoat, ferner durch Äthylendiamintetraacetat (Trilon), vollständig gehemmt. Die Trilon-Hemmung wird durch Ca^{++} , Mg^{++} oder Mn^{++} teilweise wieder aufgehoben. Die Colostrokininogenase wird durch Trilon oder p-Chlormercuribenzoat nicht beeinflusst; es ist so die Messung ihrer Aktivität im Schwangerenserum, unabhängig vom jeweiligen Colostrokininasegehalt, möglich. Hemmt man nun in einem Ansatz mit Schwangerenserum, z.B. mens IV-V die Colostrokininase durch Zugabe von Trilon

(10 Gamma/ml) oder p-Chlormercuribenzoat (10-20 Gamma/ml), so bleibt die in der Zeiteinheit freigelegte Menge Colostrokinin hinter der von Ansätzen mit Normalserum zurück. Im Serum der letzten Schwangerschaftsmonate (mens VIII-IX), sowie im Retroplacentarserum fehlt die Colostrokininogenase; sie ist 3-4 Tage nach dem Partus wieder nachweisbar. Durch Dialyse von Serum gegen fließendes Wasser, oder durch 60 Minuten langes Erhitzen auf 57° , wird die Aktivität der Colostrokininogenase nicht vermindert; durch 20 Minuten langes Erhitzen des Serums auf 100° geht sie verloren.

B.) Charakterisierung des Colostrokininogens.

Das Colostrokininogen verschwindet bei Dialyse von Colostrum gegen fließendes Brunnenwasser vollständig; durch 10 Minuten langes Kochen des auf p_H 2 oder p_H 10 gebrachten Colostrums wird es zerstört; bei neutraler Reaktion bleibt es erhalten. Colostrokininogen ist also niedermolekular, thermostabil, säure- und laugenempfindlich. Bei Aufbewahrung des Colostrums in der Tiefkühltruhe ist Colostrokininogen mindestens 1-2 Monate haltbar. Der Colostrokininogengehalt der Kuhmilch nimmt bis zum 4.-6. Tag nach dem Kalben deutlich zu und dann langsam ab, ist aber selbst 3 Wochen nach dem Kalben noch wesentlich höher als in der handelsüblichen Kuhmilch.

Anreicherung des Colostrokininogens.

Es liegt nahe, Colostrokininogen durch Dialyse von Colostrum gegen stehendes Wasser und nachfolgendes Einengen des Außendialysates anzureichern. Dieses Vorgehen führt jedoch zu großen Verlusten an Colostrokininogen, ebenso die Enteiweißung des Colost-

rums durch Essigsäure, Trichloressigsäure, Aceton oder Äthanol. Eine Anreicherung von Colostrokininogen auf das 50 fache gelingt aber mit Hilfe von Amberlite IR- 4B mit einer Ausbeute von rund 50%. Dazu wird der wasserfeuchte Amberlite mit Colostrum im Verhältnis 1:1 (v/v) im Becherglas verrührt; der Amberlite wird dann abzentrifugiert und mit destilliertem Wasser auf der Zentrifuge ausgewaschen. Das vollständig adsorbierte Colostrokininogen wird mit 0,1 n Salzsäure eluiert. Das Eluat enthielt 60-80 Gamma organische Substanz / ml. Im aufsteigenden Papierchromatogramm mit Butanol-Eisessig-Wasser (80:20:20), Laufzeit 24 Stunden, ergaben sich 3 Ninhydrin positive Flecke von niedrigem Rf-Wert. Die angereicherte Substanz erwies sich bei Aufbewahrung, selbst bei 0° nur etwa 24 Stunden beständig; an Amberlite adsorbiert, war sie aber auch bei Zimmertemperatur mehrere Tage haltbar.

Charakterisierung und Anreicherung von Colostrokinin.

Colostrokinin ist thermolabil und niedermolekular. Eine Anreicherung der Substanz gelingt durch Adsorption an Amberlite, wie für Colostrokininogen beschrieben. Danach entspricht eine 30-40 Gamma organische Substanz enthaltende Colostrokininlösung in ihrer Wirkung am Uterus etwa der von 1 Gamma Histamindichlorhydrat. Eine papierchromatographische Untersuchung des so gereinigten Colostrokinins im aufsteigenden Chromatogramm auf Schleicher Schüll Papier No 2043 b und Butanol-Eisessig-Wasser(80:20:20) als Lösungsmittel ergab 3 Ninhydrin positive Flecke von niedrigem Rf-Wert. Die Substanz ist in diesem Zustand sehr labil und verliert ihre Wirkung beim Stehen in wässriger Lösung innerhalb weniger Stunden.

Zur Frage der physiologischen Bedeutung von Colostrokinin.

Da Colostrokinin weder den Blutdruck am narkotisierten Hund noch den isolierten Meerschweinchendarm beeinflusst, ist anzunehmen, daß es auch auf den Blutdruck und die Darmmotorik des Säuglings keinen Einfluß hat. Dagegen kann man vermuten, daß die glatte Muskulatur der Milchdrüsengänge durch Colostrokinin angeregt wird. Auch bei der Involution des entleerten Uterus könnte Colostrokinin eine Funktion innehaben, vorausgesetzt, daß Colostrokininogen von der Brustdrüse in die Blutbahn abgegeben wird. Es ist bekannt, daß bei nichtstillenden Müttern die Uteruskontraktion und -Involution post partum geschwächt und verzögert ist. Die Zunahme der Colostrokininase und die Verminderung der Colostrokininogenase im Schwangerenserum hätten dann den Sinn, eine vorzeitige Uteruskontraktion zu verhindern.

Literaturverzeichnis

1. Frey, E.K., Kraut, H., Werle, E. Kallikrein
Stuttgart, Enke 1950
2. Hilton, S.M. u. Lewis, G.P. J. Physiol. 128
3. Hilton, S.M. u. Lewis, G.P. J. Physiol. 129
4. Hilton, S.M. u. Lewis, G.P. J. Physiol. 134
5. Nesen, R. u. Körprich, H. Die Milchwissenschaften
Jg. 2, 1947
6. Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T. Amer. J. Physiol. 156
7. Schachter, M. u. Thain, E.M. Brit. J. Pharmacol.
9, 352, 1954
8. Üresin, E.R. Beiträge zur Kenntnis und
Zusammensetzung des Sili-
wri- Yoghurts. Ankara 1935
9. Werle, E. u. Preisser, F. Naturwissenschaften 1956
10. Werle, E. u. Berek, U. Biochem. Z. 320, 136, 1950.

An dieser Stelle darf ich dem Leiter des wissenschaftlichen
Laboratoriums der chirurgischen Universitätsklinik,

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle,
für die Überlassung des Themas sowie für viele wertvolle
Anregungen herzlich danken.

Dem Direktor der chirurgischen Universitätsklinik,
Herrn Prof. Dr. E. K. Frey, danke ich für die Überlassung
eines Arbeitsplatzes.

Lebenslauf

Am 14. 6. 1933 wurde ich als Sohn des Bürgermeisters Paul Henselmann und dessen Ehefrau Maria, geb. Fecker, in Laiz Krs. Sigmaringen geboren.

Mit 6 Jahren kam ich in die Volksschule in Laiz, die ich nach 4 Jahren verließ, um das staatl. Gymnasium in Sigmaringen zu besuchen, wo ich dann im Frühjahr 1953 mein Abitur machte. Vom Sommersemester 1953 bis Sommersemester 1958 studierte ich an der Universität München Medizin; im Dezember 1958 legte ich die ärztliche Prüfung in München ab.

Auf Vorschlag von Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle wurde ich im Frühjahr 1959 in die Studienstiftung des deutschen Volkes aufgenommen.

Ich beabsichtige, ab Sommersemester 1959 Chemie zu studieren.

München, im April 1959

Lothar Henselmann

